

R. 7064

0/2.1-T.62. (3)

1000

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

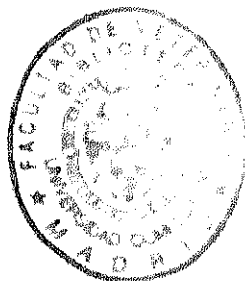
Departamento de Microbiología

BIBLIOTECA UCM



5300899719

**ADAPTACION DE NUEVOS METODOS DE
DIAGNOSTICO PARA RINONEUMONITIS
EQUINA Y SU VALORACION
EPIZOOTIOLOGICA EN ESPAÑA**



Luis Enrique Martín Otero

Madrid, 1992



La Tesis Doctoral de D. Juan Enrique
MARTÍN OTERO
Titulada Adaptación de nuevos métodos de
diagn. para el diagnóstico de...
Director Dr. D. José Manuel Sánchez Barrio
fue leída en la Facultad de Veterinaria
de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día 28
de Octubre de 1991, ante el tribunal
constituido por los siguientes Profesores:
PRESIDENTE Guillermo Suárez FERNÁNDEZ
VOCAL Manuel RODRÍGUEZ SÁNCHEZ
VOCAL Francisco RODRÍGUEZ FERRI
VOCAL María ARIAS NEIRA
SECRETARIO Isabel LOUR BUEFA

habiendo recibido la calificación de AC. S. D.
CON CALIFICACIÓN POR VOTACIÓN

Madrid, 28 de Octubre de 1991
EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

UNIVERSIDAD: COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD Y DEPARTAMENTO: VETERINARIA - MICROBIOLOGIA

TITULO DE LA TESIS: ADAPTACION DE NUEVOS METODOS DE
DIAGNOSTICO PARA RINONEUMONITIS EQUINA
Y SU VALORACION EPIZOOTIOLOGICA EN
ESPAÑA

AUTOR: LUIS ENRIQUE MARTIN OTERO

DIRECTOR DE LA TESIS: JOSE MANUEL SANCHEZ-VIZCAINO RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

ADAPTACION DE NUEVOS METODOS DE DIAGNOSTICO
PARA RINONEUMONITIS EQUINA Y SU VALORACION
EPIZOOTIOLOGICA EN ESPAÑA

Tesis presentada por
LUIS ENRIQUE MARTIN OTERO
para optar al grado de
Doctor en Veterinaria.

Madrid, 1 de Septiembre de 1991

Quiero con todo cariño, agradecer la gran ayuda y comprensión que he tenido de Mavi y Silvia, en los momentos difíciles por los que he pasado. También, recordar en este momento a mi madre y sobre todo a mi padre, por la gran ilusión que tenía depositada en este trabajo.

Esta tesis doctoral, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Análisis Clínicos (Sección de Virología), del CENTRO MILITAR DE VETERINARIA y en el Departamento de Sanidad Animal, del CENTRO DE INVESTIGACION Y TECNOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRARIAS, bajo la dirección del Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaino Rodríguez.

V. B.



AGRADECIMIENTOS

Expreso mi máximo agradecimiento, al Dr. José Manuel Sánchez Vizcaino Rodriguez, por la dirección, interes y buenos consejos que me ha dado para realizar este trabajo, así como por haber creado en mí, constancia e ilusión en mi formación profesional.

A mi amiga y compañera Herminia Aguinaga "Minuca", por su gran ayuda, ya que sin ella me hubiera sido difícil de llevar a cabo esta tesis.

A los Veterinarios Militares, destinados en las Unidades donde se ha realizado la toma de muestras para este estudio, por su gran ayuda y colaboración.

A todos los soldados, que durante el periodo en el que se ha desarrollado este trabajo, han colaborado de una forma entusiasta y eficaz, pero muy especialmente a mi amigo Javier Bretón.

Al Dr. Jose Angel Escribano, a la Dra. Marisa Arias y a todo el grupo de Virología del Departamento de Sanidad Animal del Centro de Investigación y Tecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, por su inestimable colaboración en la puesta a punto de dichas técnicas.

Deseo dar las gracias a todos mis compañeros del Departamento de Microbiología y Análisis Clínicos del Centro Militar de Veterinaria (Madrid), por su apoyo en el desarrollo del mismo.

A la Dirección del Centro Militar de Veterinaria, en cuyos laboratorios se ha desarrollado principalmente este trabajo, por la gran colaboración y ayuda prestada en todo momento.

Finalmente, agradecer al Dr. Lucas Domínguez, Catedrático del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de Madrid, sus buenos consejos, así como el haber aceptado la ponencia de esta tesis.

ADAPTACION DE NUEVOS METODOS DE DIAGNOSTICO

PARA RINONEUMONITIS EQUINA

Y SU VALORACION EPIZOOTIOLOGICA EN ESPAÑA

II - 9	ESTUDIO CINETICO DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS Y MARCAJE METABOLICO DE ESTAS CON ^{35}S -METIONINA	54
II.9.1.	CONTAJE DE MUESTRAS RADIOACTIVAS	55
II - 10	METODOS ANALITICOS DE PROTEINAS	56
II.10.1.	ELECTROFORESIS EN GELES DE BIS-ACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS Y TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A FILTROS DE NITROCELULOSA	56
II - 11	SUEROS	57
II - 12	METODOS SEROLOGICOS	58
II.12.1	INMUNORREACCION SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.-IMMUNOBLOTTING	58
II.12.2.	SERONEUTRALIZACION	58
II.12.3.	ENZIMO-INMUNO-ENSAYO (ELISA INDIRECTO) ..	59
III -	<u>RESULTADOS</u>	61
III - 1	ESTUDIO RELACIONANDO LAS DISTINTAS CARACTERISTICAS OBSERVADAS EN LOS ANIMALES Y SU LUGAR DE PROCEDENCIA	62
III.1.1.	RESPECTO AL CLIMA	62
III.1.2.	RESPECTO A LA EDAD	63
III.1.3.	RESPECTO AL PESO-SEXO-RAZA	64
III.1.4.	RESPECTO A LAS CONDICIONES DE HABITABILIDAD	65
III - 2	ESTUDIO LABORATORIAL	65
III.2.1.	RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA INDIRECTO	65
III.2.1.a.	POTROS	66
III.2.1.b.	YEGUAS	71
III.2.1.c.	SEMENTALES	75
III.2.1.d.	COMPARACION DE VALORES POR ELISA ENTRE LOS SUEROS POSITIVOS NEGATIVOS Y VACUNADOS	82
III.2.2.	EVALUACION DEL ELISA INDIRECTO CON LA TECNICA DE SERONEUTRALIZACION	83

III.2.3.	COMPARACION DE RESULTADOS ENTRE LAS TECNICAS DE ELISA INDIRECTO Y SERONEUTRALIZACION	83
III.2.4.	ANALISIS DE PROTEINAS.....	85
III.2.5.	IMUNOREACCION SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA.- IMMUNOBLOTTING	87
III.2.5.a.	POTROS	88
III.2.5.b.	YEGUAS	90
III.2.5.c.	SEMENTALES	92
III.2.6.	COMPARACION DE RESULTADOS ENTRE LAS TECNICAS DE ELISA INDIRECTO E IMMUNOBLOTTING	94
IV - DISCUSION		96
IV - 1	SITUACION DE LA RINONEUMONITIS EQUINA EN ESPAÑA ..	97
IV - 2	CARACTERISTICAS ESTUDIADAS	98
IV - 3	VALORACION DE LAS TECNICAS DE TRABAJO	101
V - CONCLUSIONES		105
VI - BIBLIOGRAFIA		107

I - ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD

1.1 INTRODUCCION

1.1.1 HISTORIA

Aunque la enfermedad respiratoria de los caballos fué reconocida y señalada en los primeros escritos de las enfermedades de los animales, la etiología compleja de este cuadro no fué descrita hasta 1934, cuando se desarrollaron y aplicaron los métodos virológicos. Aunque ya en 1911 Bassett demostró que la causa de la enfermedad respiratoria equina era un agente filtrable, también Binnet y Edwards en 1922, sugirieron que el aborto equino era consecuencia de infección vírica, no siendo posible demostrar sus afirmaciones por no existir entonces técnicas de aislamiento y de caracterización de los virus relacionados. Más tarde, al comienzo de la década de 1930 estos mismos autores aislaron el virus responsable y posteriormente Doll (1931) lo denominó virus de la Rinopneumonitis.

A partir de 1934, los investigadores han revelado que existen varios virus asociados con enfermedades respiratorias de los équidos, uno de los cuales lo designan como el virus de la Rinopneumonitis, siendo este nuevo virus también responsable de una causa importante de aborto. Más tarde, se dieron cuenta que debido a la alta prevalencia del virus y de la inadecuada inmunidad que producía la vacuna, los caballos padecían una reinfección (Studdert, 1974).

Tras la puesta a punto de técnicas serológicas que podían detectar en el animal infectado el desarrollo de anticuerpos humerales, se dió un gran avance en el estudio de estas enfermedades. Estas técnicas fueron, la Fijación de Complemento (Doll y Bryans, 1952b), la Seroneutralización (Thomson y col. 1976) y el Enzimo-Inmuno-Ensayo (Dutta y col. 1983). Otro avance de gran importancia científica en el conocimiento de esta enfermedad, fué la aportación de Studdert y col. en 1981, que definieron mediante endonucleasas de restricción para el DNA del virus, dos subtipos dentro del RVV-1, el subtipo fetal y el

subtipo respiratorio, al primero le llamó EHV-1 y al segundo EHV-4. También, según Allen y col. 1983; Studdert y col. 1986, el análisis del DNA viral electroforéticamente, permitió apreciar alguna diferencia entre los dos subtipos. Sin embargo Meyer y col. 1987, utilizaron una misma vacuna viva contra la fase abortiva y respiratoria, revelando un único modelo de DNA para los dos subtipos.

Esto hace, que hoy día no este todavía claro ni el mecanismo de infección, ni la posible variedad que pueda tener el EHV-1.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA Y DISTRIBUCION

El herpesvirus equino tipo-1, es la mayor causa viral de las enfermedades respiratorias agudas en caballos durante el primer y segundo año de vida, siendo considerado como endémica en la mayoría de las poblaciones equinas (Bryans 1.969; Studdert 1.974; Powell y col. 1.978).

En Estados Unidos se hizo un estudio con este virus, aislándose en 22 de 27 potros que murieron en una granja durante una epidemia, que se caracterizó por un cuadro abortivo y muertes perinatales, esto les hizo pensar que las epidemias de enfermedad respiratoria entre caballos jóvenes, proviene de granjas infectadas con yeguas preñadas (Hartley y Dixon 1.979). El aborto no ocurrió, aunque las yeguas preñadas estaban expuestas durante el curso de la epidemia. Más tarde, hubo un numero de casos de infección de EHV-1 asociados a un síndrome de parálisis. Este último síndrome era generalmente esporádico, pero las epidemias han sido reconocidas (Saxegaard 1.966; Greenwood y Simson 1.980; Crowhurst y col. 1.981; Thein 1.981).

Con la presencia de los síndromes respiratorios, abortivos y nerviosos, la epidemiología de la infección con EHV-1, es algo más complicada de detectar.

Lo que si parece claro, es que el HSV-1 está extendido por todo el mundo, incluso en nuestro país.

1.1.1 ETIOLOGIA

La Rinopneumonitis equina está causada por un virus herpes equino, denominado en un principio tipo-1.

El herpesvirus pertenece a la familia "Herpesviridae", con una estructura entre ellos muy similar.

1.1.1.1. CLASIFICACION

Esta familia se divide en tres Subfamilias:

Subfamilias:

Especies:

<u>α1 ALPHAHERPEVIRINAE</u>	- Virus Herpes tipo 1 (herpes labial).
<u>γ2 GAMA2</u>	- Virus Herpes tipo 2 (herpes genital)
	- Virus de la Rinotraqueitis bovina
	- Virus Herpes Cercopithecine 2 (SAB)
<u>β1 BETA1</u>	- Virus Herpes B Simiae o Cercopithecine 1 (puede infectar accidentalmente al hombre).

- | | |
|---------------------|---------------------------------|
| | - Virus de la Pseudorrabia. |
| | - Virus III de los conejos. |
| | - Virus de la Rinoneumonitis |
| | equina: |
| <u>Poikilovirus</u> | . EHV-1 (tipo fetal) |
| | . EHV-4 (tipo |
| | respiratorio) |
| | - Probablemente el Virus Herpes |
| | felino. |

- | | |
|-----------------|-------------------------------|
| <u>Varicela</u> | - Virus de la Varicela Herpes |
| | Zoster o tipo 3. |

2) BETAHERPESVIRINAE

Especies:

Genero:

- | | |
|------------------------|------------------------------------|
| | - Citomegalovirus humano (tipo 5). |
| | - Citomegalovirus animal: |
| <u>Citomegalovirus</u> | . Inclusiones víricas del |
| | cerdo de Guinea. |
| | . Cuerpos de inclusión en |
| | rinitis en cerdos. |
| <u>Muromegalovirus</u> | - Citomegalovirus murino. |

3) GAMMAHERPESVIRINAEEspecies:Genero:

- | | | |
|-------------------------------|--|------------------------------------|
| | | - Virus Epstein-Barr (tipo 4). |
| | | - Virus Herpes Cercopithecine 12 |
| <u>Lymphocryptovirus</u> | | (Baboon). |
| | | - Virus Herpes pongine(chimpance) |
| | | - Virus de la Enfermedad de Mareck |
| <u>Thetalymphocryptovirus</u> | | (gallid 2). |
| | | - Virus Herpes del pavo (meleagrid |
| | | 1) |
| | | - Virus Herpes Saimirii 2(monos). |
| | | - Virus Herpes Ateline 2 (clase |
| | | 810). |
| | | |
| <u>Rhadinovirus</u> | | - Virus Herpes Ateline 3 (clase |
| | | 73). |
| | | - También en esta subfamilia se |
| | | puede asociar con el carcinoma |
| | | renal en ranas. |

Estos virus animales tienen muy poca relación inmunológica con los herpesvirus humanos, a excepción del virus B de los monos (Alphaherpesvirinae) que puede producir reacciones cruzadas con el virus del Herpes Simple (Alphaherpesvirinae).

I.1.3.b. ESTRUCTURA

Está constituido por un virus ADN, de simetría de cápside icosaédrica, con un tamaño entre 120-200 nm. y cuya estructura posee de fuera a dentro, una doble envoltura originada en la membrana nuclear de la célula huésped, teniendo portanto una envoltura lipídica sensible al eter y al cloroformo, con pequeñas

proyecciones a intervalos, a continuación tiene una zona granulosa compuesta por proteínas globulares, una cápside de 85-110 nm. de diámetro, con 162 capsómeros (9,5x12,5 nm.) de los que 12 son pentámeros, situados en los vértices, y 150 hexámeros, repartidos sobre las caras y a lo largo de las aristas. El cápside observado al microscopio electrónico tiene tres capas concéntricas: dos opacas y una central transparente. (Foto nº1)

ESTRUCTURA DE LOS HERPESVIRUS

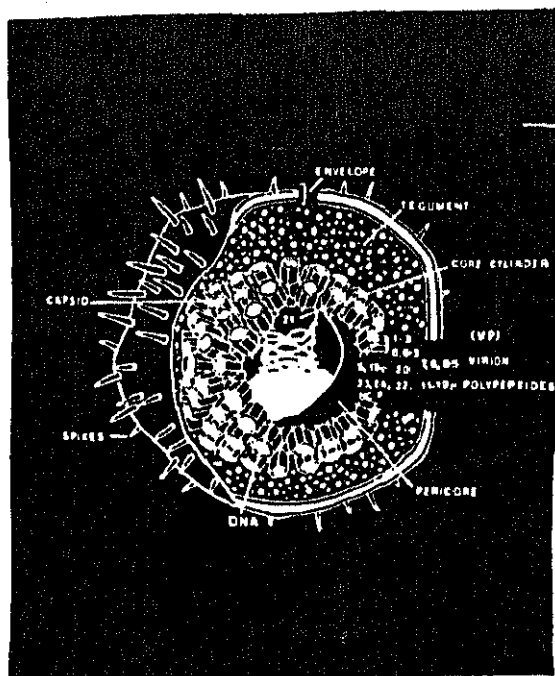


Foto nº1. Esquema de la estructura de los Herpesvirus. Distribución de sus proteínas estructurales.

1.1.1.5. ACIDO NUCLEICO

Un core central de 10 nm., con un ADN bicatenario entre $80-150 \times 10^5$ de peso molecular en Daltons (virus Herpes Simple: 95×10^5 ; virus varicela Zoster: $80-86 \times 10^5$; Citomegalovirus: 145×10^5 ; virus Epstein-Barr: 114×10^5). Su relación Guanina-Citosina en mol/di es: Herpes Simple tipo 1: 67%, Herpes Simple tipo 2: 69%, varicela Zoster: 46%, Citomegalovirus: 58,8% y el Epstein-Barr: 59% (Pumarola y col. 1987, Dulbecco y Ginsberg 1988).

La composición química de un virión de un Herpes Simple contiene: 25 a 30 proteínas específicas del virus (70% del virión), una larga y doble cadena de la molécula ADN (7% del virión), envuelta lipídica (22% del virión), gran cantidad de fosfolípidos específicos derivados de la membrana nuclear, y una pequeña cantidad de poliaminas dentro de la nucleocápside y dentro de la envoltura. Los demás herpesvirus examinados, tienen una composición similar a esta (Dulbecco y Ginsberg 1988).

1.1.1.6. PROTEÍNAS ANTIGÉNICAS

Antigénicamente se distingue un antígeno "V", de la partícula vírica responsable de las reacciones de fijación de complemento; un antígeno "P", soluble, inductor de anticuerpos neutralizantes, y un antígeno "G", soluble, responsable también de reacciones de fijación de complemento, no encontrándose ningún antígeno común entre la familia de los herpesvirus. (Pumarola y col. 1987, Dulbecco y Ginsberg 1988).

1.1.1.7. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS Y DE CULTIVO

Desde el punto de vista físico-químico son virus muy frágiles, que se inactivan a temperatura ambiente por el calor (56°C durante media hora), eter, alcohol, antisépticos, radiaciones

ultravioletas, etc. Resisten por el contrario, la desecación (hasta 14 días), el frío (-70°C) y los ciclos de congelación y descongelación rápidos (Pumarola y col. 1987). En el caballo se mantiene infectivo alrededor de 35 a 42 días (Bagust 1971). No obstante Studdert (1974), sugiere que un contacto próximo es necesario para la transmisión del EHV-1, ya que son virus muy delicados y no sobreviven mucho tiempo fuera de su medio.

Se cultivan en embrión de pollo y en cultivos celulares. En la membrana corioalantoidea a 37°C y en uno a cuatro días dan unas vesículo-pústulas de 1-2 mm. de diámetro, redondas y mucho más pequeñas que la de los poxvirus, de las que se diferencian claramente (Dulbecco y Ginsberg 1988). En ellas se diferencian cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos, pudiendo los Citomegalovirus presentar también inclusiones basófilas en el núcleo. Los cultivos celulares son los métodos de elección, pudiéndose emplear células del primer explante (riñón de mono, de cordero o sobre todo, de conejo, cepa RK/13), de línea continua (Hela, KB, HEp 2, Detroit 6, BHK-21) o diploides humanas, como los fibroblastos (cepa WI 38). El efecto citopático es bien claro: a las 24 horas aparecen placas de lisis, con células gigantes o sincitios, en las que se demuestran inclusiones intranucleares eosinófilas, tipo A, Feulgen-negativas, que marginan la cromatina nuclear, separada del cuerpo de inclusión por un halo claro. Los nucleolos desaparecen a diferencia de las lesiones producidas por los adenovirus. Estos son los cuerpos de inclusión descritos primeramente por Lipschütz, en 1921 (Pumarola y col. 1987, Dulbecco y Ginsberg 1988).

1.1.3.f. REPLICACION

El ciclo de multiplicación del virus *in vitro* es el siguiente: tras la absorción o penetración del virus, éste pierde su envoltura y queda en el citoplasma. Se decapsula y el ADN libre comienza a codificar la síntesis de enzimas de replicación (timidinkinasa, ADN-polimerasa y ADN-asa, y ARN-polimerasa ADN-

dependiente) y el AMN mensajero. Este dirige la síntesis de tres grupos de polipéptidos, denominados A (proteínas no estructurales), B (proteínas no estructurales y algunas estructurales) y C (proteínas estructurales).

El AMN se replica en el núcleo y las proteínas de la estructura en el citoplasma pasan al núcleo, donde tiene lugar la encapsulación y ensamblaje de las partículas. Al atravesar el cariotema, aquellas adquieren la envoltura o pépico. Solo el 20% del AMN sintetizado se incorpora a las cápsulas, lo que explica la existencia de partículas vacías y desnudas. Los viriones quedan mucho tiempo en el retículo citoplasmático y pueden pasar de célula en célula, a pesar de la existencia de anticuerpos en el medio extracelular. Los viriones se liberan por lisis celular (Balboa y Ginsberg 1988). (Foto nº 2)

CICLO DE MULTIPLICACION DE LOS HERPESVIRUS

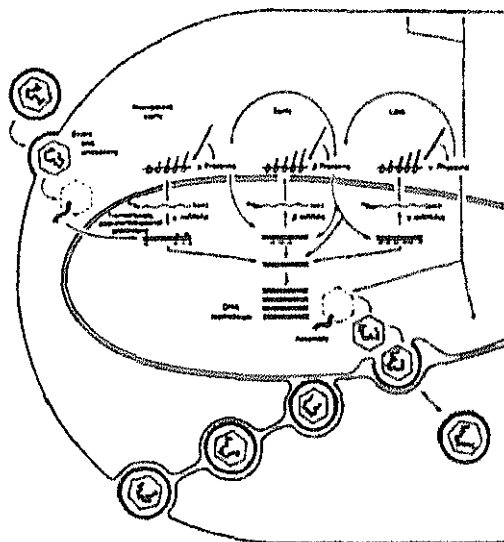


Foto nº2. Secuencia de las fases de multiplicación de los virus Herpes Simple, así como del proceso de transcripción y coordinación secuencial de mRNAs y síntesis de proteínas (α , β , γ), que actúan en la replicación del DNA y en la estructuración del virión. (Diagrama modificado de B. Roizman, Universidad de Chicago).

1.1.1.g. POSIBLE DIFERENCIACION DE SUBTIPOS

En base a las diferencias entre títulos de neutralización cruzada, trataron de distinguir dos subtipos. El subtipo-1 que, era considerado prototipo de aislados fetales, mientras que el subtipo-2 significaba ser el representante de los aislados respiratorios (Bartha 1.970; Burrows 1.970; Burrows y Goodridge 1.973). Además, estos últimos autores aportaron datos para ser reconocidos por diferentes características de crecimiento in vitro. Hicieron una inoculación, de lo que denominaron el subtipo fetal, en el tracto respiratorio de ponys, observando un mejor

crecimiento en el tejido nasofaríngeo y produciéndose rápidamente una viruela muy parecida a la del subtipo respiratorio. Sin embargo, esto puede ser interpretado como que los subtipos fatales fueran también patógenos respiratorios y que no todos los aislados de fetos sean subtipo-1, ni todos los aislados respiratorios sean del subtipo-2.

Bartha 1.970; Burrows 1.970; Burrows y Goodridge 1.973, diferenciaron los dos serotipos, el subtipo 1, que en América aislaron el K y D, que pertenecían al aislado fetal y el subtipo 2, que era de aislados respiratorios y que identificaron con los nombres de Japón W-43 y Army 183.

Entre las excepciones que antes hemos mencionado, destaca la de el Army 183, clasificada al comienzo en el subtipo 2 (Burrows 1.970), siendo encontrada como fetal o subtipo 1, mediante estudios con enzimas de restricción (Turtinen y col. 1.981). Según Bell (1953) y Bryans (1969), el aislado respiratorio del EHV-1 de Army 183, implica la transmisión de caballo a caballo y el paso al feto se realiza a través de la inoculación directa intravascular. Esto hace pensar que el original del Army 183 puede ser en el feto, como consecuencia de enfermedad respiratoria.

Una reciente propuesta epidemiológica concerniente al EHV-1, demuestra que el análisis del RNA del virus por endonucleasa de restricción, así unido el RNA viral a las secuencias de nucleótidos específicos. Preliminarmente experimentos utilizando hamster e inoculándole el EHV-1, demostraron diferencias en el genoma en dos posiciones (O'Callaghan y col. 1.978). Recientemente Sabina y col.(1.981), Studdert y col.(1.981) y Turtinen y col.(1.981), usaron enzimas endonucleasas de restricción, para comparar los patrones de corte de los aislados fatales y respiratorios, mostrando al poco tiempo una gran similitud entre las muestras de los aislados de cada grupo.

Ese descubrimiento, confirma una temprana clasificación, basada en productos de neutralización cruzada (Sabina 1.980), con alguna notable excepción.

Así, los puntos de corte con enzimas de restricción pueden ser el método de elección para distinguir el EHV-1. Studdert y col.(1.981), fueron más lejos y propusieron que las diferentes enzimas de restricción para los subtipos fetal y respiratorio, fueran tan marcadas que en realidad los subtipos fueran reconocidos como especies diferentes, tipo-1 el fetal y tipo-4 el respiratorio.

Pero esta diferencia no es clara todavía, como así lo manifiesta Studdert y col. (1984), que observaron la producción de abortos en yeguas que habían sido inoculadas intrauterinamente con el EHV-4 (tipo respiratorio). Estos autores estudiaron mediante las endonucleasa de restricción de DNA como: *Bam* HI, *Eg* I, *Pvu* II, *Xho* I y *Hind* III, que las bandas obtenidas del inóculo fetal y del EHV-4 (tipo respiratorio), eran indiferenciables.

Otros autores como Allen y col.(1983), consiguen aislar en caballos con síndrome respiratorio, el subtipo-1 en un 20%, siendo en el resto, aislado el subtipo-2. También, Shimizu y col.(1959) y Allen y col.(1983), hicieron un estudio con casos abortivos, siendo aislado en la mayoría de estos, el subtipo-1. No obstante, aislaron en cinco de los casos abortivos, el subtipo-2.

La diferencia de subtipos del EHV-1, hoy día no está muy clara, a pesar de los estudios que se están realizando con endonucleasas de restricción, como así lo manifiesta la revista "The Veterinary Record", Vol.124, n° 17 de Abril de 1989, la cual dice, que antes de 1979, el subtipo-1 (abortivo) era aislado raramente en granjas de caballos, pero si, se aislaba normalmente en fetos abortados y en animales que hubieran contactado con dicho subtipo abortivo.

Estas mismas incógnitas, son también puestas de manifiesto en estos últimos años, por el Royal Veterinary College y el Animal Health Trust, que se basan en los datos obtenidos de los distintos diagnósticos dados por sus centros. También, como dato significativo, estos mismos organismos, resaltan la mínima incidencia de la enfermedad, en los casos de parálisis. Estas variaciones se pueden explicar, al considerar heterogéneas las bandas reconocidas del DNA del subtipo BHV-1 respiratorio (Sabine y col.1981; Allen y col.1981), que al comparárlas con las bandas, bastante homogéneas del subtipo-1 abortivo, aparece una gran similitud entre ellas (Allen y col. 1981).

Esto es ahora lo manifiesto, en el futuro, estas diferencias podrían ser tenidas en cuenta en la investigación del BHV-1 para su inmunidad, especialmente en relación con las vacunas y epidemiología, aunque en la actualidad no está claro la posible variedad del BHV-1.

1.1.1. PATOGENIA

Un factor que contribuye a la prevalencia de la Rinoneumonitis equina, es el hecho de que como muchos otros herpes, el virus se adhiere a las membranas mucosas, en este caso, las del tracto respiratorio superior, la conjuntiva y el tracto genital. El virus es capaz de sobrevivir hasta seis semanas en el pelo y durante un tiempo más limitado en madera, cuerda, metal y materiales similares (William 1988).

El camino natural de infección, es presumiblemente la vía superior del tracto respiratorio, acompañado de una viremia, resultando transferida la infección a la placenta y al feto, con su consecuente aborto (Bryans y Prickett 1970).

Existen herpesvirus patógenos para el hombre, los animales e incluso para los hongos. Producen infecciones latentes y recurrentes, sin embargo su patogenia no está del todo clara.

Estos, como grupo se caracterizan por una amplia difusión y fácil transmisión.

Doll y Bryans (1.963c) establecieron que la mayoría de los caballos se infectan al principio de su vida, normalmente en el destete, sin embargo la inmunidad a la reinfección era de corta duración (3 a 5 meses), de este modo, un gran número de caballos serán frecuentemente reinfectados durante su crianza y/o a lo largo de su vida. Generalmente la reinfección resulta con infecciones débiles o inaparentes, pero en el caso de yeguas preñadas puede conducir a abortos durante los últimos cuatro o cinco meses de gestación, con una incidencia de aborto en manadas desprotegidas de hasta un 2% (Doll y Bryans 1.963b).

Doll y Bryans (1.963b) asumieron que los caballos jóvenes están infectados por virus reactivado de los caballos más viejos, especialmente de sus más próximos. La enfermedad respiratoria aguda en caballos jóvenes puede causar altos niveles de propagación, los cuales presumiblemente incrementan la dosis de virus contagioso, y de este modo la tasa de incidencia de infección. Esto proporciona la oportunidad de infección de las yeguas en el estado apropiado de gestación, produciendo el aborto. A veces en algunas ocasiones, los abortos epizooticos han comenzado por abortos en una yegua recientemente preñada (Kawakami y col. 1.970; Burrows y Goodridge 1.979; Sabine 1.979).

Esto puede indicar que el feto abortado, las membranas y los líquidos pueden ser una importante fuente de infección para las yeguas y potros próximos a ellos.

No obstante, para que la yegua pueda infectarse, tiene que ocurrir:

- 1) Que el tipo de virus sea el apropiado.
- 2) Que la inmunidad de la yegua, haya disminuido hasta un nivel en el que el virus penetra en el tracto respiratorio pudiendo ocasionar una viremia y atravesar la placenta.

En algunos casos naturales y experimentales, el aborto ha ocurrido a menudo, presentándose como un pre-requisito de enfermedad neurológica (Jackson y Kendrick 1.971; Little y Thoreen 1.976; Jackson y col. 1.977), pero series trabajos (Sister y Klingasborn 1.976; Thomson y col. 1.979; Platt y col. 1.980; Crowhurst y col 1.981; Thein 1.981) han demostrado que la enfermedad también ocurre en yeguas estériles, sementales, machos castrados y potros. Semajantes observaciones sugirieran que la variedad de síndromes atribuidos a la infección de herpesvirus, podían ser asociados con particularidad al EHV-1. Por eso, el EHV-1, se había considerado que era antigénicamente homogéneo, teniendo todos los síntomas y produciendo potencialmente una enfermedad similar. Sin embargo, durante la pasada década, casos indicativos suponían diferencias antigénicas en el EHV-1.

Similarmente, Studdert y Blackney (1.979) encontraron que algunos aislados fetales, asociados esporádicamente con abortos, eran similares en la mayoría de los casos, en el tamaño de las placas, al de los aislados respiratorios.

La patogenia del aborto se explica, por que el virus alcanza el feto por vía transplacentaria a traves de los linfocitos. El virus produce un edema de las vellosidades coriales, impidiendo el intercambio gaseoso madre-feto y sufriendo este último procesos de asfixia.

1.1.1 INMUNIDAD

Estudios de la evolución del sistema inmune del feto equino, indican que este es capaz de responder a antígenos específicos a los docecientos días de gestación (Martin y Larsen 1973; Morgan y col. 1975).

El desarrollo clásico que tienen los anticuerpos frente a una viriasis por herpes, es el siguiente: en una primera fase de la

infección aparecen anticuerpos fijadores de complemento, pudiendo estos persistir largo tiempo después de la infección y evolucionando probablemente en dientes de sierra, en función de una nueva reinfección o del resurgimiento de un virus latente (Bagust y Pacos 1972; Doll y Bryans 1962b).

Siguiendo a estos anticuerpos, aparecen los seroneutralizantes, que persisten mucho más tiempo después de la infección, aunque al aparecer más tarde en la infección, no son los ideales para realizar un diagnóstico precoz (Vulcano y col. 1988; Kaji 1963).

La inmunidad resultante de la infección natural en el tracto respiratorio, se sospecha que dura poco tiempo. A pesar de la persistencia de anticuerpos neutralizantes, la mucosa respiratoria puede ser asintomática, reinfectándola a los 3 o 4 meses (Doll 1961).

La inmunidad por el contrario, en la enfermedad que cursa con aborto es más duradera. Raramente las yeguas por infección natural han abortado en gestaciones consecutivas, mientras que las yeguas inoculadas intravenosamente con virus vivo, al comienzo de la gestación y reinoculadas a los 4 o 6 meses después, han abortado y los fetos infectados después de la segunda inoculación, contenían un alto título de anticuerpos neutralizantes (Doll y col. 1955; Doll y Bryans 1963c).

Los fetos equinos, no reciben anticuerpos maternos transplacentalmente, de este modo la inmunidad pasiva es únicamente por calostro (Kendrick y Stevenson 1979). La ingestión de calostro inmune puede conducir a la protección con altos títulos de anticuerpos frente al EHV-1, en la circulación (Doll 1961; Kendrick y Stevenson 1979), pudiendo ser la duración de la inmunidad conferida, directamente proporcional al título de anticuerpos calostrales y a la cantidad ingerida dentro de las dos primeras horas de vida. También estos autores pronosticaron, que el tiempo de eliminación de los anticuerpos EHV-1 derivados

de la madre, era aproximadamente de 180 días.

Studdert (1974) sugiere que la inmunidad pasiva, puede ser convertida en inmunidad activa sin signos clínicos de enfermedad, siempre que el potro sea sometido al EHV-1 durante el periodo donde la inmunidad calvestral está disminuida. Frymus (1980) hace notar que otros factores como los anticuerpos calvestrales pueden interferir con la respuesta de inmunidad humoral del potro, siguiendo activa la infección de EHV-1. Potros de 3 y 4 meses de edad, un tiempo en que los niveles de anticuerpos de la madre eran deficientes, dejan de manifestar una perceptible respuesta de anticuerpos de EHV-1 en la primera exposición.

Complementariamente potros menores de un año de edad desarrollan una pobre respuesta de anticuerpos con una vacunación de virus vivo del EHV-1 (Dutta y Shipley 1975; Gerber y col. 1977).

Frymus (1980) demuestra, que los potros de aproximadamente tres semanas de vida, desarrollan una respuesta pobre de anticuerpos frente al virus vivo del EHV-1, sin embargo ellos pueden mostrar una respuesta de inmunidad mediada por células (CMI), que es detectada por un ensayo de inhibición de migración de leucocitos.

Por lo general en el primer año de vida la respuesta de anticuerpos frente a EHV-1 es pobre (Dutta y Shipley 1975; Gerber y col. 1977), pero la incidencia del título de anticuerpos neutralizantes detectada es más grande que la incidencia de estos en la enfermedad clínica (Studdert, 1974).

Gerber y col. (1977) demostraron, que los potros menores de 1 año de edad, muestran un gran incremento de CMI, en respuesta al EHV-1, comparandola con la de caballos de 1 y 2 años de edad. También supirieron que estos potros sucumben a la infección en el primer año de vida, quizás debido a una insuficiente respuesta celular.

En el segundo año de vida, la respuesta de anticuerpos es alta (Gerber y col. 1977), esta puede depender de:

1) Exposición repetida al virus del EHV-1, siendo los caballos más viejos, los más apropiados para experimentar con ellos en repetidas exposiciones.

2) El desarrollo de una resistencia a la infección en una determinada edad, dependiendo de una maduración de macrófagos y quizás de otros mecanismos no específicos (Darlington 1978).

3) Numerosas exposiciones repetidas son suficientes para obtener una amplia protección (Thomson y col. 1976).

Bryana (1969) y Frymus (1980) apreciaron que un alto título de anticuerpos circulantes en caballos mayores de 1 año de edad, no se podía relacionar con la protección, sugiriendo estos, que la inmunidad mediada por anticuerpos no es el único o esencial mecanismo implicado en la protección (Dutta y Shipley 1975; Wilks y Coggins 1976; Gerber y col. 1977; Frymus 1980). El papel de CMI fué investigado más tarde por Wilks y Coggins 1976-1977a y Dutta y col. 1980.

Wilks y Coggins (1976), utilizando ponys de 1 y 2 años libres de especificidad patógena, observaron que en el tiempo que los ponys no tenían anticuerpos, se detectaron CMI moderadas por una respuesta específica "in vitro" de linfocitos en blastogénesis.

También se detectó, la respuesta CMI en 12 de los 16 ponys con anticuerpos positivos. Esto hace pensar que los otros cuatro ponys con anticuerpos positivos pueden no haber sido capaces de desarrollar una respuesta CMI, o que una respuesta inicial de CMI haya declinado hacia niveles inapreciables, mientras que los niveles de anticuerpos persistan. Esto puede explicar que algunos caballos mayores de 1 año de edad con un alto nivel de anticuerpos neutralizantes pueden sin embargo ser infectados con EHV-1.

Bryans (1969) inoculando intramamariamente a yeguas preñadas con EHV-1, pretendía correlacionar la resistencia a la reinfección, con un cierto umbral de nivel de anticuerpos neutralizantes (21:100). Sin embargo la posibilidad de infección del feto y del aborto, seguida de una viremia en la yegua, es impreciable (Bryans y Prickett 1970; Gleason y Coggins 1980).

Estos abortos pueden ocurrir en presencia de altos niveles de anticuerpos neutralizantes (Doll y Bryans 1961a), sugiriendo, que las CMI pueden ser importantes en la prevención del aborto. Sin embargo esto es ahora más tenido en cuenta, por la evidente existencia inconfundible encontrada en fetos y sistema respiratorio del EHV-1, esto indica que este umbral de protección de niveles de anticuerpos pueda no necesariamente correlacionarse con la protección del aborto, a no ser que los niveles de anticuerpos hayan sido inducidos por el feto antes que por el aparato respiratorio.

La protección del aborto una vez que la infección se ha iniciado en el feto, puede en realidad implicar CMI. Wilks y Coggins (1977a), sugirieron que los mecanismos citotóxicos, exponían de este modo el virus a los anticuerpos neutralizantes, pudiendo ser importante en el bloqueo del virus a propagarse y de este modo prevenir la infección y el aborto.

Ellos demostraron la presencia de actividad citotóxica "in vitro", asociada con suero fresco acumulado y leucocitos periféricos, antes que el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, siguiendo la infección de ponys con EHV-1.

Más tarde, en experimentos "in vivo" con hamsters, demostraron que la presencia de anticuerpos en células linfoides, era suficiente para proteger a los hamsters de la infección, pero que una vez que la infección se inicia, la combinación inmunitaria de ambos, CMI y anticuerpos, era necesaria para la recuperación (Wilks y Coggins 1977b).

En gestaciones de los mamíferos, las actividades CMI están generalmente disminuidas durante el último trimestre (Kasakura 1971). Esto puede explicar que el 95% de los abortos producidos por EHV-1, sucedan en este periodo de tiempo (Doll y Bryans 1963b).

Gerber y col. (1977) demostraron la depresión de CMI en yeguas gestantes comparadas con yeguas no gestantes. Esta depresión puede hacer a ciertas yeguas preñadas vulnerables a la infección, reinfección o reactivación del EHV-1.

Dutta y Campbell (1977) fueron incapaces de correlacionar la presencia o ausencia de CMI al final de la gestación, con potros normales o abortados. Sin embargo Pachciarz y Bryans (1978) apreciaron que los bajos niveles de CMI en la preinfección con EHV-1, puede tener correlación con la incidencia del aborto.

Las glicoproteínas del EHV-1, juegan un papel significativo en la obtención de una respuesta de base humoral y celular, en los animales afectados. Por lo tanto, la precisa caracterización de las glicoproteínas del virus, serían de excepcional ayuda para el entendimiento de la respuesta inmune al EHV-1, así como para el desarrollo de vacunas eficaces para la prevención de la enfermedad (Shimizu y col. 1989).

Estudios previos, han indicado que al menos 11 glicoproteínas pueden ser identificadas en la purificación del EHV-1 (Turtinen y Allen 1982). Siendo la mayoría de ellas componentes importantes del virus, en su respuesta inmunológica (Allen y Bryans 1986).

Además, la localización genómica del código secuencial de las seis mayores glicoproteínas del EHV-1, ha sido recientemente vista (Allen y Yeargen 1987). Sin embargo, es escaso el conocimiento de la función inmunológica y de la estructura molecular de cada glicoproteína del EHV-1, aunque las glicoproteínas de otros herpes hayan sido bien caracterizadas (Babiuk y col. 1987).

I.1.6 CUADRO CLINICO Y PATOLOGIA

Generalmente la Rinoneumonitis equina se manifiesta con un cuadro respiratorio similar al de otras enfermedades respiratorias de los équidos. También a veces aparecen posteriormente cuadros abortivos y nerviosos, que el ganadero no relaciona con los posibles cuadros respiratorios que tuvo anteriormente. Es así, como según avanza la enfermedad su patología se manifiesta y mediante observación clínica de esta, es como se realiza el diagnóstico, equivocando en la mayoría de los casos la Rinoneumonitis equina, con otras de similar característica como la Influenza o Arteritis vírica.

La enfermedad tiene los siguientes cuadros clínicos:

- 1) Infección respiratoria en caballos susceptibles.
- 2) Aborto en yeguas preñadas.
- 3) Enfermedad perinatal.
- 4) Enfermedad del Sistema Nervioso Central (Mieloencefalitis).

Cuadros Clínicos

* 1) Enfermedad Respiratoria: aunque el virus puede infectar el tracto respiratorio de cualquier caballo, los animales más viejos que han tenido una expansión repetida, presentan cierta resistencia contra la enfermedad. Estos animales sufren una infección libre de síntomas. En los animales más jóvenes sin expansión previa, como los potros destetados y los yearlings, muestran síntomas respiratorios de dos a diez días después de la infección. Como síntomas más sobresalientes, se observan:

descarga serosa por fosas nasales, siendo más tarde esta mucopurulenta, fiebre (hasta 41,1°C), ligera anorexia (focos necróticos en faringe) y depresión con un periodo de duración de hasta siete días. También, aparece una necrosis extensiva de células epiteliales del tracto respiratorio superior, acompañado por una acusada respuesta inflamatoria. También en esta zona puede aparecer una hiperplasia linfonodular con infartación de los folículos linfoides, que al contaminarse con gérmenes,

generalmente estreptococos tipo c, se transforman en verdaderos abscesos de pñs. El virus puede alcanzar los pulmones, especialmente en caballos jóvenes o estresados y causar una bronconeumonía, produciendo de forma secundaria una infección bacteriana, especialmente con el estreptococo de Lancefield grupo c (Studdert 1974; Burrows y Goodridge 1979; Liu 1979).

* 2) Abortos: yeguas preñadas pueden abortar transcurridos de catorce a ciento veinte días después de la infección, sin presentar ningún síntoma clínico de tipo respiratorio (Doll y Bryans 1962a). Casi siempre, suelen abortar del sexto al onceavo mes de gestación (Bryans 1978).

El virus además, produce un edema agudo de pulmón en el feto y aparecen petéquias en la mayoría de los órganos por causa de la asfixia (Bryans y col.1977).

Las lesiones apreciadas en un feto abortado de seis meses de gestación, es diferente a aquellos fetos abortados a los siete meses de gestación (Prickett 1970). Los abortos tempranos se caracterizan por una fuerte autólisis fetal, con una difusa dispersión de inclusiones intranucleares y sin una respuesta inflamatoria local. Por el contrario, las lesiones macroscópicas provenientes de abortos tardíos, son: ictericia, petéquias en membranas y mucosas, edemas subcutáneos, excesivo fluido pleural, edema pulmonar, esplenomegalia con prominentes folículos linfoides y focos blancos de necrosis hepática.

Las características de las lesiones microscópicas, son: bronquitis, neumonitis, grande necrosis en la pulpa blanca del bazo y focos de necrosis hepática, acompañado de una marcada respuesta inflamatoria. En todos los casos, las lesiones fueron asociadas con típicas inclusiones intranucleares herpéticas (Corner y col. 1963; Prickett 1970). De cualquier modo estas inclusiones intranucleares pueden desaparecer rápidamente, con un resultado de fagocitosis o autólisis post-mortem (Bagust 1971).

Lesiones en fetos tempranos sugieren una ausencia de respuesta fetal a la infección viral, en contraste con lesiones en fetos abortados en los últimos cuatro meses de gestación, los cuales muestran reacciones celulares características del virus (Prickett 1970).

En la yegua, la única lesión importante observada siguiendo la inoculación fetal y antes del aborto, fué una distensión en la región linfática (Prickett 1970). Microscópicamente los tejidos variaban desde un aspecto normal hasta presentar un grado bajo de infiltración perivascular con una marcada infiltración de eosinófilos en el tejido interglandular conectivo del útero. De cualquier modo, habrá una separación completa del alantocorion del endometrio uterino. Después de abortar, las lesiones más observadas fueron una intensa infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas, junto con vasos localizados, justo en la capa glandular del endometrio.

* 3) Enfermedad Perinatal: breves referencias a cerca del nacimiento de potros débiles, en relación con EHV-1 abortivo, han sido relatados (Hayes 1976). Más recientemente la enfermedad neonatal de los potros es asociada con la infección prenatal por EHV-1, sin aparecer abortos o enfermedad respiratoria (Dixon y col. 1977-1978; Hartley y Dixon 1979). En este síndrome, aparecen nacimientos débiles con potros deprimidos, los cuales mueren dentro de las veinticuatro horas y potros aparentemente normales al nacimiento, que desarrollan un fuerte dolor en la cavidad torácica, dentro de las dieciocho a las veinticuatro primeras horas y mueren alrededor de las veinticuatro a setenta y dos horas del nacimiento.

Algún otro síndrome neonatal diferente, fué descrito por Bryans y col. (1977) atribuyéndolo a la infección prenatal por EHV-1 durante la fase terminal de la gestación. Sin embargo estos autores no pudieron demostrar el EHV-1 en inclusiones intranucleares o aislar el EHV-1 de los tejidos afectados. Los signos más significativos incluyen, dolor en la cavidad torácica,

diarrea no fétida y debilidad durante las primeras semanas de vida. Los potros supervivientes a las dos semanas de edad, sucumbieron ante una gran variedad de infecciones bacterianas secundarias.

Hartey y Dixon (1979) realizaron una detallada descripción de lesiones observadas en potros durante una epidemia de EHV-1, con una gran mortalidad perinatal. Las principales lesiones se manifestaron en el tracto respiratorio. Los pulmones eran voluminosos y firmes, siendo frecuente en ellos el color morado y con atelectasia. También se apreciaron estriaciones hemorrágicas de la submucosa a lo largo de la tráquea y bronquios superiores. Los nódulos linfo-bronquiales estaban a menudo alargados, congestivos y edematosos. En las lesiones microscópicas se incluye una extensa alveolitis histocítica no supurativa, un foco agudo de bronquitis necrótica y/o bronquiolitis e inclusiones eosinófilas intranucleares.

* 4) Enfermedad del Sistema Nervioso Central (Mieloencefalitis): Las enfermedades nerviosas asociadas con la infección del EHV-1, han ido surgiendo con una frecuencia creciente en los quince últimos años (Thein 1981; Charlton y col. 1976) y han sido reproducidas experimentalmente por inoculaciones subcutáneas e intranasales del virus EHV-1 (Mumford y Edington 1980). Epidemias naturales producidas por EHV-1 cursando con enfermedad nerviosa, son normalmente asociadas con abortos y/o enfermedades respiratorias, pero hay casos que pueden existir sin aparecer aborto o enfermedad respiratoria (Thein 1981). Los signos clínicos pueden variar desde una lenta ataxia, hasta la completa caída con un seguimiento de la parálisis de los miembros. El periodo de incubación es de alrededor de siete días, tanto en casos naturales como experimentales (Greenwood y Simson 1980).

Son características apreciadas, una vasculitis, con una degeneración secundaria hipóxica (disminución de la concentración de oxígeno en sangre) en el tejido neural adyacente, apareciendo importantes cambios histopatológicos en ambos casos de

mieloencefalitis, tanto natural como experimental (Platt y col. 1980). En particular Jackson y col. (1977) fueron capaces de reproducir un estado paralítico, con una gran vasculitis por inyección subcutánea del EHV-1, en yeguas preñadas del Ejército Australiano. Cambios vasculares, eran más predominantes en la médula que en el cerebro y al poco tiempo, las lesiones de la materia blanca de la médula eran más manifiestas que las lesiones de la materia gris (Jackson y Kendrick 1971). Evidencias como inclusiones intranucleares en neuronas, en infecciones neurotróficas no son apreciadas en los casos producidos por EHV-1 (Thomson y col 1979).

En las encefalitis asociadas con herpesvirus en otras especies, por ejemplo, el virus herpes simple en el hombre, el herpesvirus en el ganado bovino y el virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos, hay una clara evidencia de neurotrofismo primario con multiplicación del virus en neuronas y neurofagia (Platt y col. 1980). En contraste, el EHV-1 apreciado en el Ejército Australiano, no hay neurotrofismo en cerebro equino, apareciendo más tarde en la inoculación intracerebral directa (Prickett y Bryans 1970; Jackson y col. 1977).

Experimentalmente, la mieloencefalitis producida por EHV-1 se caracteriza por una difusa vasculitis, más prominente en el tejido nervioso, afectando también al endotelio y pulmones (Platt y col. 1980). Se propuso por parte de Jackson y col. 1977, que durante la viremia aparecen altos niveles de anticuerpos en la circulación, propagándose el virus directamente por la circulación a las células infectadas y a las células endoteliales y de estas, a las células endoteliales contiguas sin una fase extracelular.

Una vez que la infección endotelial es iniciada, el virus tiende a propagarse centrífugamente e infecta las células parenquimales adyacentes. Esto, responde a una severa y generalizada vasculitis sin destrucción neuronal primaria, asociada con EHV-1. Focos maláceos (blandos), presumiblemente

desarrollan secundariamente una trombosis en los vasos locales y parálisis resultante con iaquemia y cambios metabólicos en el tejido nervioso (Jackson y col. 1977). Esto hizo pensar que las lesiones vasculares fueron debidas a la interacción inmunológica específica del EHV-1 en el endotelio vascular (Platt y col. 1980). Thomson y al. en 1979, descubren un incremento de cuatro veces el título de anticuerpos a EHV-1, en caballos con mieloencefalitis, que en aquellos que han estado en contacto con la enfermedad. Seroconversiones similares con altos títulos, cinco días después o más del ataque de la enfermedad, fueron documentadas en ambos campos y en casos experimentales (Jackson y col. 1977), los cuales mantienen la teoría de Dinter y Klugeborn (1976), de que las enfermedades nerviosas suceden por la reinfección o posibles infecciones recurrentes de caballos afectados. El virus es difícil de aislarlo en los tejidos nerviosos de caballos con EHV-1 asociado con mieloencefalitis; si bien en algunos caballos afectados han sido descritos y aislados el virus (Thain 1981). La patogénesis de la mieloencefalitis con EHV-1 no está totalmente acabada, pero el fracaso del aislamiento del virus es probablemente como consecuencia de complejos virus-anticuerpo, formados ambos in vivo o in vitro, durante la preparación de tejidos para la inoculación en cultivos celulares (Platt y col. 1980).

Análogamente, ha sido comparada la mieloencefalitis del EHV-1 y alguna otra enfermedad, con la fiebre catarral maligna, en el que una vasculitis primaria puede ser asociada a una mieloencefalitis (Thomson y col. 1979).

1.1.7 DIAGNOSTICO

Desde el punto de vista sintomático, el diagnóstico puede ser falso, debido a la igualdad de síntomas que presentan con otras enfermedades de tipo respiratorio y que nos dan lugar a falsas conclusiones. Es por eso, por lo que tenemos que dirigir siempre el diagnóstico através de un estudio laboratorial.

5300899719

Para que exista una gran efectividad en el control de la enfermedad y así poder aplicar las medidas oportunas, es imprescindible un diagnóstico lo más rápido posible en el laboratorio.

Los métodos de diagnóstico utilizados hasta la fecha son los siguientes:

A) Si queremos realizar un test rápido y económico, se puede estudiar en una tinción, cuerpos de inclusión intracelulares eosinófilos, en las células hepáticas y en el epitelio bronquiolar o alveolar. Sin embargo este método no es muy sensible, ya que si la enfermedad acaba de iniciarse, la lesión no se ha manifestado, pudiéndonos dar falsos negativos.

B) Examen por microscopia electrónica en una biopsia, de un tejido afectado que contenga partículas virales en varios estados de maduración.

C) Aislar el virus en cultivos celulares o en embrión de pollo, viendo su efecto citopático o las vesículas producidas en la multiplicación del mismo.

D) Observar, la subida de título de anticuerpos, mediante técnicas como Sero neutralización y Fijación de Complemento, realizando en estas un segundo control a los 14 o 21 días después de la primera muestra, para ver la Seroconversión.

Estos últimos métodos son los más utilizados para el diagnóstico laboratorial, pero estas técnicas presentan los inconvenientes de laboriosidad y lentitud, presentando además, la Fijación de Complemento falta de sensibilidad.

También, se empieza a utilizar en algunos países para el diagnóstico de esta enfermedad, el Enzimo-Immuno-Ensayo (Vulcano y col. 1969), aunque no existen mucha experiencia en esta técnica. Respecto a la utilización de la técnica de Immunoblotting para el diagnóstico de esta enfermedad, no hemos encontrado ninguna referencia.

1-1 OBJETIVO Y JUSTIFICACION

La Rinoneumonitis se encuentra en todo el mundo en unos porcentajes de incidencia muy altos, por lo que todo parece indicar que existe una gran reserva del virus en la naturaleza.

En España, existe una considerable falta de información y en ocasiones información errónea sobre esta enfermedad. Esto se debe en gran parte, al hecho de que la Rinoneumonitis equina es difícil de diagnosticar clínicamente. La ambigüedad que rodea a esta enfermedad, es provocada también porque los criadores de caballos no siempre relacionan el síndrome respiratorio con su secuela abortiva. No existe una conexión obvia entre un catarro o gripe en los potros y un aborto varias semanas después en una yegua aparentemente sana.

Debido a que generalmente los propietarios de caballos no crían sus animales, no tienen un interés en la prevención de los abortos víricos. Como resultado, no existe el concepto universal de la Rinoneumonitis equina como una enfermedad de dos fases principales, una respiratoria y otra abortiva.

Desde el punto de vista económico, en cualquier zona en la que exista un interés financiero en el uso de los caballos, esta enfermedad, supone una amenaza tangible. La forma respiratoria de la enfermedad, interrumpe cualquier actividad de fuerza, ya que esto tiende a agravar los síntomas e inducir efectos secundarios. Así pues, los caballos de labor, exhibición o de carreras no deberían realizar ninguna actividad, cuando padecieran la enfermedad. En las operaciones de cría caballar, la pérdida de uno o dos potros debido a abortos por la enfermedad, supone una gran merma económica.

En España, el seguimiento e incidencia de la enfermedad, no se realizaba debido a que no estaban puestas a punto, técnicas de diagnóstico de fácil utilidad y gran sensibilidad.

Por estas razones, ha sido el objetivo en este trabajo, el poner a punto, las técnicas de ELISA INDIRECTO e IMMUNOBLOTTING, para diagnosticar anticuerpos de esta enfermedad, así como realizar un estudio serológico a nivel nacional para observar la incidencia de la misma, teniendo en cuenta la situación climatológica, edad, raza, sexo y condiciones de habitabilidad de los équidos estudiados.

II - MATERIAL Y METODOS

II-1. AGCER202101 Y APARATOS

- Agitador Immunoblotting. Immunetics RPD.
- Agitadores Vortex. Grisel (mod. 30).
- Balanza Sartorius (tipo 1401A-MP8-1).
- Campana de flujo laminar Telstar (mod. BV 10).
- Centrífugas de mesa: * JOWAN (mod. CR 312 Refrigerada).
 * SELECTA CENTROMIX (mod. S-549).
 * SORVALL INSTRUMENTS MICROSPIN 24-S.
- Congelador de -80°C REVCO (mod. ULT 1686 UOB).
- Cubetas de electrotransferencia BICMETRA (tipo NR G41 mini) y BIO-RAD (grande).
- Estufa de CO₂ GCA/PRECISION.
- Falcón estériles de 25, 75 y 150 cm³. Corning.
- Fotocolorímetro TITERTEX MULTISKAN MK II (FLOW), con impresora INVEN BX-1000.
- Fuente de alimentación E-C APPARATHS CORP (mod. EC-105).
- Lavador ELISA DUNLEY WELLNASH III.
- Micropipetas FINNPIPETTE de 1-5, 5-50, 50-200 µl.
- Microscopio invertido de contraste de fases NIKON TMS (tipo 104).
- PH-metro METEOR PH (mod. 996).
- Pipeta multicanal DYNATECH MICROFITER DE 50-200 µL.
- Placas de cultivo celular de 96 pocillos. Costar.
- Placas para ELISA BIORADA (tipo F ELISA).
- Placa de inmunodetección MINIBLOTTER 16 IMMUNETICS y grande de BIO-RAD.
- Placas de Transferencia BICMETRA (tipo NR B33)
- Sonificador VIBRA-CELL. SONIX MATERIALS (mod. VC 300).
- Ultracentrífuga KONTROM INSTRUMENTS CENTRIFON T-2050.

II-2 SOLUCIONES QUIMICASSOLUCIONES QUIMICAS PARA IMMUNOBLOTTINGBuffer de Electroforesis

Tris - base ----- 15,1 g ----- 25 mM
 Glicina ----- 72 g ----- 192 mM
 Dodecil Sulfato Sódico -- 5 g ----- 0,1 % (SDS)
 Agua (hasta) ----- 5 litros
 Ajustar el pH a 8,3 con Tris o Glicina
 Conservar en frigorífico.

Gel separador

Concentración de acrilamida ----- 12,5% ----- 17% ----- 10%
 30% acrilamida | ----- 2,5 ----- 3,4 ----- 2
 0,8% bisacrilamida |
 1,88 M Tris-CLH pH 8,8 ----- 1,2 ----- 1,2 ----- 1,2
 0,5% SDS ----- 1,2 ----- 1,2 ----- 1,2
 Agua ----- 1,7 ----- 0,2 ----- 1,6
 Temed ----- 5 µl ----- 5 µl ----- 5 µl
 10% de persulfato amónico ----- 30 µl ----- 30 µl ----- 30 µl

Gel apelmazador (Stacking)

30% acrilamida | ----- 0,33 ml
 0,8% bisacrilamida |
 0,625M Tris-CLH pH 6,8 ----- 0,4 ml
 0,5% SDS ----- 0,4 ml
 Agua ----- 0,87 ml
 Temed ----- 2 µl
 10% de persulfato amónico ----- 10 µl

Tampón de dilución (a igual volumen que la muestra)

0.625M Tris-CLH pH 6,8	2 ml
SDS	0,2 g
Glicerol	5 ml
B-mercaptetanol	0,5 ml
Azul de bromofenol (1% en etanol)	0,1 ml
Agua	2,4 ml

Buffer de Transferencia

Tris - base	25 mM	3,0285 g
Glicina	150 mM	11,260 g
Metanol		100 cc
Agua (hasta)		1 litro
pH	8,3	

conservar en frigorífico.

Solución de Retura

Tris - Clorídrico (pH 6,8 - 0,625 M)	2 ml
Dodecil Sulfato Sódico (SDS)	0,2 g
Glicerol	5 ml
B - Mercaptetanol	0,5 ml
Azul de Bromofenol al 1% con Etanol	0,1 ml
Agua destilada	2'4 ml

Añadir a un volumen de muestra , un volumen de solución de ruptura.

Solución de Azul de Coomassie

Azul brillante de Coomassie R - 250	2 g
Etanol	425 ml
Metanol	50 ml
Ácido Acético	100 ml
Agua destilada	425 ml

Solución de Negro Amido

Negro Amido -----	0,5 g
Metanol -----	45 ml
Agua destilada -----	45 ml
Acido Acético -----	10 ml

Solución de Desteñido para el Gel

Metanol -----	40 cc
Acido Acético -----	10 cc
Agua (hasta) -----	100 cc

Solución de Desteñido para Papel

Metanol -----	40 cc
Acido Acético -----	5 cc
Agua (hasta) -----	100 cc

Solución Bloqueante

Leche molico desnatada -----	10 g
PBS (hasta) -----	1 litro

Solución Substrato Cromógeno

Cloronaftol -----	30 mg
Metanol -----	10 cc
TBS (hasta) -----	50 cc
Agua destilada al 30% -----	60 µl

TBS (Tampón Tris)

Tris Clorídrico -----	4,84 g -----	20 mM
Cloruro Sódico -----	58,48 g -----	500 mM
Agua destilada (hasta) -----		2 litros
Ajustar pH a 7,5 con ClH		

Stock Acrilamida - Bisacrilamida

Acrilamida -----	30 g
Bisacrilamida -----	0,8 g
Agua destilada (hasta) -----	100 cc
Guardar en frigorífico	

SOLUCIONES QUIMICAS PARA ENALCOIMUNOENSAYOPBS (Tampón Fosfato)

Cloruro Sódico ----- 7,650 g
 Fosfato Disódico ----- 0,724 g
 Fosfato Monopotásico ----- 0,210 g
 Agua Destilada (hasta) ----- 1 litro
 pH ----- 7,2
 Conservar a 4°C

Solución de lavado (PBS-tween)

PBS ----- 1 litro
 Tween 20 ----- 0,5 ml
 Conservar a 4°C

CBM (Tampón Carbonato)

Carbonato Sódico ----- 1,59 g
 Bicarbonato Sódico ----- 2,93 g
 Agua Destilada (hasta) ----- 1 litro
 pH ----- 9,6
 Conservar a 4°C

Tampón Citrato

Acido Cítrico ----- 2,14 g
 Fosfato Disódico ----- 3,54 g
 Agua Destilada (hasta) ----- 400 ml
 pH ----- 5
 Conservar 4°C

Solución de frenado (Acido Sulfúrico 1 M)

Acido Sulfúrico (d=1,84) ----- 93,5 ml
 Agua Destilada (hasta) ----- 1 litro

Sustrato Cromógeno

Tampón Citrato ----- 15 ml
 OPD ----- 6 mg
 Agua Oxigenada 30% ----- 23 µl

Tampón de dilución

Solución de lavado -----	1 litro
Seroalbúmina Bovina (BSA) -----	10 g

MEDIOS DE CULTIVO CELULARMedio de Crecimiento

MEM -----	900 cc.
Piruvato Sódico (100 mM) -----	10 ml
Gentamicina (50 mg/ml) -----	1 ml
Aminoácidos no esenciales -----	10 ml
Suero fetal de ternera (al 10 %) -----	100 cc

Medio de Mantenimiento

MEM -----	900 cc
Piruvato Sódico (100 mM) -----	10 ml
Gentamicina (50 mg/ml) -----	1 ml
Aminoácidos no esenciales -----	10 ml
Suero fetal de ternera (al 2 %) -----	20 cc

Medio de Congelación

Suero fetal de ternera -----	9 cc
Dimetil sulfóxido -----	1 cc

MEDIOS DE MARCAJE METABOLICO DE PROTEINASMedio de Marcaje

MEM con glutamina -----	2%
Suero Fetal Bovino -----	2%
³⁵ S-Metionina -----	300µci/ml

Medio de centelleo

PPO -----	5%
DM-POPOP -----	1%
Tolueno -----	66,6%
Tritón-100 -----	33,3%

II-3 REACTIVOS

- Acido Acético. Probus.
- Acido Cítrico. Probus.
- Acido Etilen Diamino Tetra Acético. Merck.
- Acido Sulfúrico. Probus.
- Acrilamida. Bio-Rad.
- Aminoácidos no esenciales 100x. Flow.
- Anti-IgG de caballo marcada con peroxidasa RAH/PO. Nordic.
- Azul brillante de Coomassie R-250. Bio-Rad.
- Azul de Bromofenol. Merck.
- Bicarbonato Sódico. Panreac.
- Bisacrilamida. Bio-Rad.
- Carbonato Sódico. Probus.
- Cloronaftol. Bio-Rad.
- Cloruro Sódico. Probus.
- Dimetil Sulfóxido. Fluka.
- Dodecil Sulfato Sódico. Bio-Rad.
- Etanol. Probus.
- Fosfato Disódico. Merck.
- Fosfato Monopotásico. Merck.
- Gentamicina 50mg/ml. Flow.
- Glicerol. Bio-Rad.
- Glicina. Bio-Rad.
- Leche desnatada Molico. Nestle.
- Medio Eagle Modificado de Dulbecco, sin Glutamina y sin Bicarbonato Sódico (MEM). Flow.
- Mercaptoetanol. Bio-Rad.
- Metanol. Probus.
- Negro Amido. Merck.
- Nonidet-P40. Merck.
- Orto Fenilen Diamina. Dakopatts.
- Peróxido de Hidrógeno 30%. Panreac.
- Persulfato Sódico. Bio-Rad.
- Piruvato Sódico. Flow.
- Sacarosa. Merck.
- Seroalbúmina Bovina (BSA). Sigma Chemical Corp.

- Suero Fetal Bovino. Flow.
- Temed. Bio-Rad.
- Tris. Bio-Rad.
- Tween 20, Panreac.

II-4. ANIMALES EMPLEADOS EN EL ESTUDIO Y SUS CARACTERÍSTICAS

Distribución geográfica:

Realizamos un estudio epidemiológico de la enfermedad, tomando muestras de diferentes regiones de España para ver la incidencia de las misma y recogiendo a su vez información de las características más importantes de estos animales, como son: edad, peso, raza, actitud, vacunaciones y clima, para su posible relación con los resultados.

Los lugares de toma de muestra fueron:

*Yeguada Militar de Cordovilla la Real (Palencia).

Raza:Tiro.

*Yeguada Militar de Lore - Toki (San Sebastian).

Raza:Pura Sangre Ingles (P.S.I.).

*Yeguada Militar de Jerez de la Frontera (Cadiz).

Raza:Pura Raza Española (P.R.E.) y Pura Raza Arabe (P.R.A.).

*Depósito Militar de Sementales Nº1 Alcalá de Henares (Madrid).

Raza:Pura Raza Española (P.R.E.).

*Depósito Militar de Sementales Nº5 (Zaragoza).

Raza:Tiro.

Estos animales los agrupamos dependiendo de su función en los grupos siguientes:

- SEMENTALES
- YEGUAS
- POTROS

Esta clasificación se realiza para ver a la hora de valorar los resultados, si hay alguna característica común en cada grupo o por el contrario no existe ninguna.

Las razas estudiadas fueron diversas, así como el número de cada una:

Bratón	70 unidades.
Hispano - Bratón	25 unidades.
Anglo - Bratón	1 unidad.
Pura Raza Española	136 unidades.
Pura Sangre Inglés	15 unidades.
Pura Raza Árabe	12 unidades.
Anglo - Árabe	1 unidades.

Total -- 262 unidades.

Todos ellos pertenecen a Centros Militares de Cría Caballar (Ministerio de Defensa).

Estos animales se utilizan normalmente para la mejora de la cabaña nacional, en sus aptitudes de tiro y de silla.

También, respecto al clima, distinguimos tres regiones a nivel nacional: a) región fría y húmeda; b) región intermedia y c) región cálida y seca.

Los datos más significativos en cuanto al lugar, raza, edad, peso, vacunaciones y toma de muestras, se resumen en los siguientes cuadros:

YERBES

TERMINAL: PENITENCIARIA Y MEXICAL

LUGAR	RAZA-NO	EDAD (entre) (entre) / X	PERO (entre) (entre) / X	VALUACIONES		TOTAL DE MEXICAL
				COMERCE	FINCA	
CERRILLAS LA REAL (Pelandia)	BRETON-11	9-13-10.1	600-900- 52	REPO- MEXICAL-11	REPO-11-00 REPO-11-00 -00	10 10-1-00
				TETANOS	REPO-00 REPO-00-00	20 20-1-00
				INFLUENZA	REPO-00 REPO-00	10 10-1-00

TERMINAL: PENITENCIARIA Y MEXICAL

LUGAR	RAZA-NO	EDAD (entre) (entre) / X	PERO (entre) (entre) / X	VALUACIONES		TOTAL DE MEXICAL
				COMERCE	FINCA	
REPO DE LA FRONTIERA (Cerrill)	PURA RAZA ESPAÑOLA-37	4-22-11.5	400-500- 190	INFLUENZA	REPO-00	10 10-1-00
	PURA RAZA ARAB-1					20 20-1-00

~~CONFIDENTIAL~~

○ ○ ○ ○ ○

[illegible]

[Illegible text]

[illegible]

EX-107-78-239 EX-107-78-239-178 Y 9224

[illegible]

II-5 VIRUS

En este trabajo se ha utilizado la cepa Kentucky del virus EHV, adaptada a células BHK-21 en su fase 21, facilitado por el Laboratorio de Sanidad Animal de Algete (Madrid).

El cultivo, lo realizamos en frascos Falcon de 75 cm² de superficie. Una vez que el tapiz celular se encuentra subconfluyente, añadimos 1,5 ml. del virus, más 4,5 ml. del medio de mantenimiento. Transcurrido una hora a 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂, de contacto del virus con las células, añadimos 15 ml. del medio de mantenimiento y lo incubamos con las mismas características anteriormente citadas.

A las 24 horas, apreciamos un efecto citopático claro, manifestándose células sincitiales y células individuales desprendidas en un 80%. Más tarde, realizamos la obtención del antígeno soluble citoplasmático, como se indica en el apartado II-7.

Este antígeno, lo fijamos en los pocillos de las placas microtiter a la dilución óptima, utilizándolas inmediatamente o bien congelándolas a -20°C, tapadas con papel parafilm, no perdiendo actividad durante 12 meses.

También este antígeno, lo utilizamos para realizar la electroforesis e inmunotransferencia del Immunoblotting.

II-6 CELULAS Y CULTIVOS CELULARES

La línea celular utilizada fué la BHK-21 (células de riñón de hamster joven), que estaba congelada en nitrógeno líquido y tratada con suero fetal de ternera al 10% y dimetil sulfoxido en proporción de 9:1 con respecto al suero fetal de ternera.

La descongelación se realizó rápidamente en baño maría a 37°C, diluyéndolas en medio de cultivo y centrifugándolas a 650 g. durante cinco minutos. Posteriormente, el pellet obtenido se resuspendió suavemente en MEM al 10% con suero fetal de ternera y sembrando en un Falcon de 25 cm².

II.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

El medio básico de cultivo empleado para las células DMK-21, fue medio Eagle Modificado de Dulbecco, sin glutamina y sin bicarbonato sódico (Flow), suplementado con piruvato sódico (100mM) 10mM, gentamicina 30mg/ml, aminoácidos no esenciales al 10% (MEM) y con un 2% o 10% de suero fetal de ternera (Flow) respectivamente.

El medio de cultivo empleado para el marcaje con ³⁵S-metionina, se obtuvo de los laboratorios Flow, adicionando al medio el aminoácido radiactivo en la proporción adecuada. Todos los medios de cultivo se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore). El cultivo de células se realizó en material de plástico esteril en Falcon o placas de cultivo (Costar).

II.1.2. CULTIVO DE CÉLULAS DMK-21

Las células DMK-21 crecieron en medio esencial MEM suplementado al 2% o 10% respectivamente con suero fetal de ternera, en atmósfera de un 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C. Cuando las células llegaron a confluencia, bien se desprendieron por dispersión con una solución de tripsina-EDTA o se infectaron con el virus. Las células infectadas con el virus, producían un efecto citopático sobre las 24 horas. (Fotos nº 3 y 4).

CULTIVO CELULAR

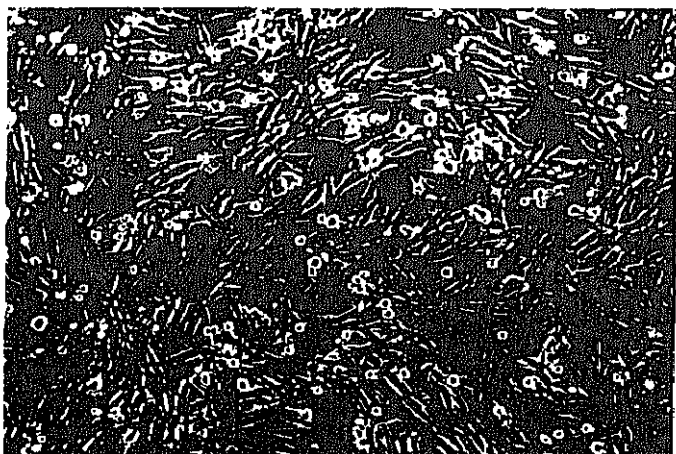


Foto nº3. Células BHK 21, infectadas con virus EHV-1.
Realizado en nuestro laboratorio. x 100.

EFECTO CITOPATICO

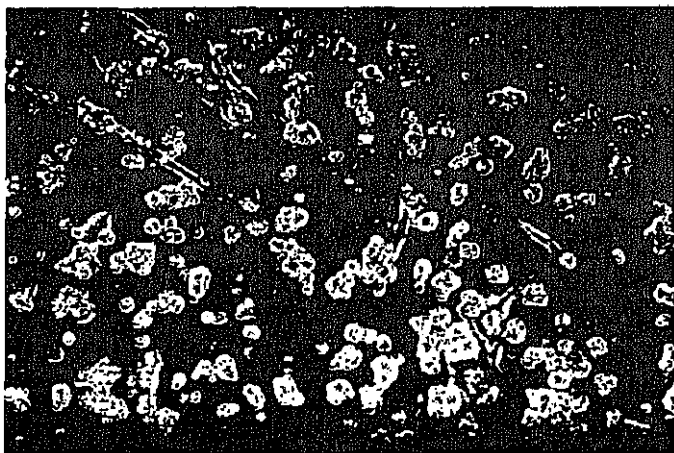


Foto nº4. Efecto citopático producido por el
virus EHV-1, en células BHK-21 a las 24-36 horas.
Realizado en nuestro laboratorio. x 100.

II-7 OBTENCION DEL ANTIGENO SOLUBLE CITOPLASMATICO

El antígeno se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Escribano y Tabarés (1987), para el virus de la Peste porcina africana. Células infectadas, se recogieron a las 24 horas con un efecto citopático aproximadamente de un 80%, sin haberse desprendido las células. Estas, las lavamos primeramente dos veces con PBS pH 7,2 y una con sacarosa 0,34 M en Tris ClH 5mM de pH 8. Después de este tercer lavado y manteniendo la sacarosa, retiramos las células infectadas con una espátula articulada, quedando estas suspendidas en la solución del tercer lavado. Para sedimentarlas, centrifugamos esta solución a 650 g durante cinco minutos a 4°C. Seguidamente las células se resuspendieron en un tampón hipotónico de sacarosa 0,067 M en Tris ClH 5 mM de pH 8, se incubaron durante 10 minutos en un baño de hielo y se lisaron por adición del detergente Nonidet P-40 (Merck), a una concentración final del 1%, que se dejó actuar durante 10 minutos a 0°C. Para recuperar la isotonicidad del medio, se añadió 1/7 del volumen total de sacarosa 64% en Tris ClH 0,4M de pH 8. Los núcleos celulares se eliminaron por centrifugación a 1000 g durante 10 minutos, tras lo cual el sobrenadante (fracción citoplasmática) se trató con EDTA 2mM, 2-Mercaptoetanol 0,05M y ClNa 0,5M.

Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó a 100.000 g durante una hora a 4°C sobre un colchón de sacarosa al 20% en Tris ClH 50mM de pH 8. La fracción obtenida por encima de la sacarosa, se utilizó como antígeno positivo para la técnica. (Foto nº 5)

A la vez y en las mismas condiciones que preparamos el antígeno positivo, realizamos la preparación del antígeno negativo, utilizando la misma línea celular, pero sin infectar. El tratamiento utilizado con estas células, es idéntico al realizado con las células infectadas, recogiendo en la última fase el sobrenadante del colchón de sacarosa al 20% y utilizándolo como antígeno negativo.

ESQUEMA DE OBTENCION DEL ANTIGENO

OBTENCION DEL ANTIGENO TRATADO CON POLIDEBILITOL.

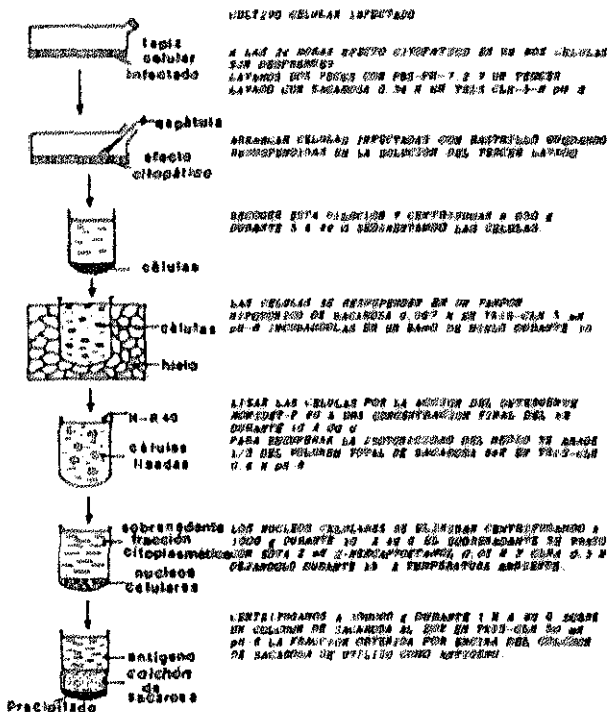


Foto nº5. Diferentes etapas de la obtención del antígeno soluble de la Rinoneumonitis equina, puesta a punto en nuestro laboratorio.

II-2 TITULACION DEL ANTIGENO POR ELISA

Para determinar la concentración óptima del antígeno, se realizó una titulación por Enzimo-Inmuno-Ensayo, mediante diluciones seriadas del mismo, con tampón carbonato (0,05M-PH 9,6), partiendo de 1/5. Las diluciones del suero y conjugado se optimizaron a la vez.

En la dilución 1/1280, se encontró una mayor diferencia de densidades ópticas a 492 nm., entre los sueros controles positivo y negativo, tomándose ésta como óptima dentro de nuestras condiciones de trabajo.

Los sueros controles positivos utilizados, fueron de animales enfermos (brote de finales de 1988 en Hospitalet-Barcelona) en pleno brote de la enfermedad.

Los sueros controles negativos, son de animales muy jóvenes, no vacunados, procedentes de madres no vacunadas.

II.2.1 VALORACION DE PROTEINAS

Se llevó a cabo el método descrito por Bauer (1986), utilizándose los reactivos de Bio-Rad. La curva de calibración se realizó con serealbúmina bovina, leyéndose las extinciones a 595 nm.

II-3 ESTUDIO CINETICO DE LAS PROTEINAS DEL VIRUS Y MARCAJE METABOLICO DE ESTAS CON ³⁵S-METIONINA

Una vez obtenido el cultivo celular de BHK-21, en Falcon de 25 cm², depositamos en una placa de cultivos de 96 pocillos, 200.000 células/pocillo, utilizando para cada fase de infección dos pocillos. Cuando estos cultivos celulares en placa llegaron a estar confluentes, se infectaron con el virus EHV-1, obteniendo

una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 10. Tras dos horas de absorción del virus a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂, se añadieron 200µl/pocillo de medio MEM suplementado con 2% de suero fetal de ternera.

Se realizó un seguimiento post-infección de 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 20 horas y 28 horas; transcurridos estos tiempos se retiró el medio y se lavó suavemente con MEM sin metionina, añadiendo 100µl/pocillo. Seguidamente, se cubrió el tapiz con medio de marcaje (MEM, 2% de suero fetal de ternera y 300µci/ml de ³⁵S-metionina) añadiendo 50µl/pocillo.

Tras dos horas de incubación a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂, se retiró el medio de marcaje, lavando a continuación cuatro veces por pocillo con 50µl/pocillo de PBS-esteril. Una vez realizado ésto, añadimos 40µl/pocillo de solución de rotura y homogenizamos recogiendo todo el volumen en un tubo eppendorf. Por último se carga un gel al 17% de acrilamida con el fin de estudiar la cinética de aparición de las proteínas víricas. El marcaje y procesamiento de las células sin infectar (controles), se realizó de forma similar a la utilizada en células infectadas.

II.2.1. CONTAJE DE MUESTRAS RADIOACTIVAS

El contejo de la radiactividad existente en las diferentes muestras marcadas con ³⁵S-metionina, se determinó, añadiendo a un volumen conocido de la muestra deseada, 2,5 ml del líquido de centelleo. Las muestras así preparadas en viales de centelleo, se introdujeron en un contador de centelleo de radiaciones β para su lectura.

II-10 MÉTODOS ANALÍTICOS DE PROTEÍNAS

II.10.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE BIS-ACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS Y TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A FILTROS DE NITROCELULOSA

Esta técnica la realizamos siguiendo el método de Pastor y col. (1988). Una vez montado el molde, se añade la solución del Gel Separador (inmediatamente después de añadir los catalizadores). A continuación añadir cuidadosamente 1 ml de agua destilada, con el fin de crear una línea interfase uniforme.

Una vez polimerizado el gel, se retirará el agua y se añadirá el gel apelmazador, colocando en este momento el peine formador de pocillos o el peine preparativo. Pasado el tiempo de polimerización, se introduce el gel en la cubeta de electroforesis, en cuyo fondo tiene unos seis-ocho centímetros de tampón de electroforesis. Se cubre la parte de arriba con tampón, se retiran los peines y se introduce la muestra con jeringa. Se coloca la tapa y se conecta a la fuente de alimentación. Para evitar distorsiones de las bandas, se debe correr a bajo amperaje. Las condiciones óptimas son: 10 mA/gel, constante toda la noche (18 horas), para geles grandes.

La separación de las proteínas del antígeno soluble se realizó por electroforesis en geles de acrilamida-DATD al 17% (1 ml. de antígeno parcialmente purificado /gel). Una vez separada las proteínas se procedió a la electrotransferencia de las mismas a papel de nitrocelulosa, en una cubeta de electrotransferencia (BIO-RAD), aplicando durante tres horas una corriente de 4 mA/cm² de intensidad y a 4°C.

El tamaño de los filtros fué de 16x20 cm. El tampón de transferencia estuvo compuesto de 20% de metanol-tris 0,02 M-glicina 0,69M.

También, se utilizaron mini-geles de 6x9 cm al 10% de bisacrilamida, realizando la electroforesis en minicubeta

(BIOMETRA), con las siguientes características:

* Gel - Apelmazador -----	20 mA/90 V		1 hora
* Gel - Separador -----	30 mA/180 V		

La electrotransferencia utilizada en estos geles pequeños, la realizamos durante una hora a 180 mA, en fase semi-seca, con electrodos de carbono (BIOMETRA).

Después de la transferencia, los filtros fueron cortados en tiras de 0,5 cm y mantenidas a temperatura ambiente, hasta realizar las inmunorreacciones con los diferentes sueros.

II-11 SUEROS

El número total de sueros utilizados para este estudio, fué de 202. Estos sueros fueron transportados desde su lugar de origen al laboratorio, en contenedores refrigerados y herméticos, en un medio de transporte rápido, recepcionándolos a las 24 horas.

Una vez llegado al laboratorio, separamos el suero y lo alicuotamos en tubos Nunc, en volúmenes de 0,1 ml., obteniendo de cada suero varias alicuotas. A continuación congelamos a -80°C, hasta su utilización.

Los sueros controles positivos, los obtuvimos de un brote de Rinoneumonitis equina, producido en Hospitalet de Llobregat(Barcelona) en el año 1987, de animales con síndrome respiratorio y cuadro paralítico, en su fase aguda.

Los sueros controles negativos, los obtuvimos de animales jóvenes, que sus madres no habían sido nunca vacunadas, ni tenían historial de haber padecido la enfermedad. Además estos animales jóvenes, se encontraban localizados en lugares abiertos y exentos de cualquier síntoma relacionado con la enfermedad.

II-12. METODOS SEROLOGICOS

II.12.1 INMUNOREACCION SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA. IMMUNODIFFUSION

Las tiras de filtro procedentes de la electrotransferencia, se incubaron con una solución que contenía como bloqueante, leche desnatada al 1% en PBS y se mantuvieron en agitación durante una hora a 37°C.

Una vez finalizado el bloqueo, se realizó la incubación de estas tiras durante una hora a 37°C, con los diferentes sueros diluidos al 1/5, en esta misma solución bloqueante. A continuación, se procedió a la incubación con el conjugado diluido al 1/2000 (RAH/PO Nordic), durante una hora a 37°C en agitación. Se volvió a lavar de la misma forma que la vez anterior y se realizó el revelado con la solución cromógena, compuesta por 10mg de 4-Cloronaftol disuelto en 10ml de Metanol y completando el volumen a 50ml, dejando reaccionar las tiras hasta que se alcanzó el máximo de coloración (unos 10 minutos), frenando posteriormente esta reacción, sumergiendo las tiras en agua. Estas tiras se dejaron secar al aire, colocandolas sobre un papel de filtro.

II.12.2 SERONEUTRALIZACION

La Seroneutralización del virus de la Rinoneumonitis equina, se realizó sobre células BHK-21, mediante diluciones dobladas de los diferentes sueros problemas, en placas para cultivo celular de 96 pocillos, con una superficie de 0,32 cm². En cada pocillo depositamos 25 µl de las diferentes diluciones de los sueros problemas, partiendo de una dilución de 1/2 y haciendolas dobladas. Más tarde, se añade 25 µl/pocillo de una solución del virus de la Rinoneumonitis equina, que contenga 100 DI₅₀.

Incubamos una hora a 37°C, para después añadir 50µl/pocillo

de una suspensión en medio de cultivo de células BHK-21, que contenga 200.000 células /ml.

Incubamos una hora a 37°C, después de la cual añadimos 100µl/pocillo de medio de cultivo. Incubamos a 37°C y observamos el efecto citopático a las 24, 48 y 72 horas.

En nuestro caso, hemos considerado un suero positivo, cuando la neutralización del efecto citopático se produce a la dilución de 1/16. Este valor lo hemos definido mediante el estudio realizado con esta técnica, para los sueros controles positivos y negativos.

II.12.3 ENZIMO-INMUNO-ENSAYO (ELISA INDIRECTO)

El test de ELISA, se realizó en microplacas según los métodos descritos por Sanchez-Vizcaino y col. (1982), Vulcano y col. (1988), con algunas modificaciones.

El antígeno diluido a 1/1280 en tampón carbonato (0,05M-pH 9,6), se distribuyó en cada pocillo a razón de 150µl, dejándolo incubar 12 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lava la microplaca cuatro veces con un tampón PBS (0,01M-pH7,2) adicionándole Tween 20 al 0,05%. Siendo esta la solución de lavado.

La dilución de los sueros, se optimizó igual que con el antígeno, siendo la dilución 1/300 la mejor para nuestras condiciones de trabajo. Esta dilución se realizó en tampón PBS (0,01M-pH7,2) más Tween 20 al 0,05% y añadiendo a esta un 1% seroalbúmina bovina (BSA), distribuyendo 150µl/pocillo e incubando durante una hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, se vuelve a lavar la microplaca cuatro veces con la solución de lavado y se le añade el conjugado (α -globulina de caballo, marcada con Peroxidasa (Nordik)) a una dilución optimizada anteriormente de 1/5000, añadiendo 150µl/pocillo e incubando

durante una hora a 37°C.

Posteriormente, la microplaca se vuelve a lavar otras cuatro veces con solución de lavado y añadimos el sustrato OPD (Orthophenyl-diamina), depositando 150µl/pocillo e incubando durante cinco minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, la reacción es frenada añadiendo 50µl/pocillo de $90\text{H}_2\text{SO}_4$. La lectura se efectuó en un lector Multiskan (Flow) a 492 nm..

En cada microplaca, se pone en las mismas condiciones que los sueros probados, un suero control positivo y otro negativo, a la vez que hacemos un control de fondo y otro de blanco.

El antígeno se coloca en la microplaca de forma, que en las columnas impares esté el antígeno positivo y en las pares el antígeno negativo, así a la hora de hacer la lectura, sustraemos el valor de las columnas pares de las impares, y obtenemos un valor más real.

III - RESULTADOS

En este trabajo se han estudiado diversos parámetros como: clima, edad, peso, sexo, raza y condiciones de habitabilidad, para comprobar su posible relación con el desarrollo de la enfermedad.

A su vez, hemos puesto a punto las técnicas de Elisa Indirecto e immunoblotting, para obtener mejores resultados con respecto a las otras técnicas utilizadas hasta la fecha.

Mediante estos nuevos métodos, se ha realizado un estudio serológico a nivel nacional, para conocer la incidencia de esta enfermedad.

III-1 ESTUDIO RELACIONANDO LAS DISTINTAS CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS EN LOS ANIMALES Y SU LUGAR DE PROCEDENCIA.

III.1.1. RESPECTO AL CLIMA.

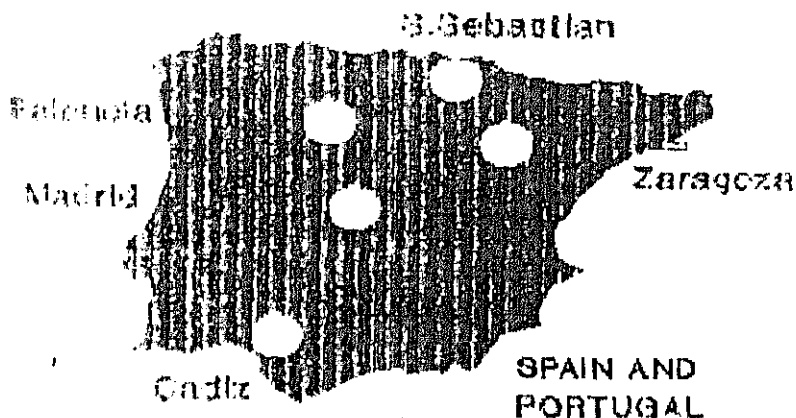
Los animales se estudiaron partiendo de las tres zonas climáticas, en las que dividimos a nuestro país, denominándose:

a) Zona de clima frío y húmedo. Su temperatura media es de 9-15°C, habiendo durante una buena parte del año temperaturas próximas a los 5°C e incluso a veces por debajo de esta. Su humedad relativa media es del 80%, y los animales que se encuentran en dicha zona residen en Cordovilla la Real (Palencia), Lore-Teki (San Sebastian) y Zaragoza.

b) Zona de clima intermedio. Su temperatura media es de 15-20°C y su humedad relativa media es del 50%. Los animales que se encuentran en dicha zona están en Alcalá de Henares (Madrid).

c) Zona de clima cálido y seco. Su temperatura media es de 21-31°C, llegando en verano a temperaturas superiores a los 38°C. La humedad relativa media es del 30%, y los animales que se encuentran en dicha zona residen en Jerez de la Frontera (Cádiz).

MAPA



Regiones de España donde se recogieron las muestras.

No hemos visto ningún dato significativo que nos pudiera indicar una relación directa entre el desarrollo de la enfermedad y la zona climática.

XIII.1.2 RESPECTO A LA EDAD.

Esta característica es de gran importancia, ya que en nuestro trabajo hemos apreciado, que el nivel de anticuerpos, varía dependiendo de la edad (Fig.1). Así, los animales adultos, tanto yeguas como sementales, presentan niveles de anticuerpo bastante más altos que los encontrados en el suero de los animales jóvenes. A su vez, dentro de la población de animales jóvenes, encontramos que aquellos animales menores de un año, presentan niveles de anticuerpo prácticamente inexistentes o son muy bajos. Mientras en los que sobrepasan el año, se aprecian unos niveles de anticuerpos superiores a los anteriores, pero nunca llegando a los que presentan los animales adultos.

Los datos clínicos ofrecidos por los diferentes centros, en donde se encontraban los animales del estudio, eran inesistentes, debido a la no presencia de manifestación clínica.

COMPARACION DE VALORES MEDIOS POR ELISA INDIRECTO SEGUN GEOGRAFIA

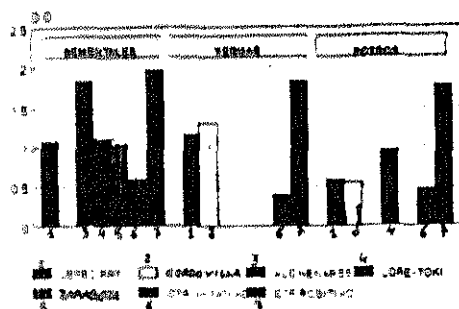


Fig. nº1. Distribución de la población equina estudiada por actitudes, dependiendo de sus valores medios, leídos en D.O. a 492 nm.

III.1.1. RESPECTO AL PESO - SEXO - RAZA

En estas tres características, no hemos apreciado en nuestro trabajo, ninguna relación que pudiera afectar de forma directa al desarrollo de la enfermedad o a la presencia de anticuerpos específicos.

III.1.1. RESPECTO A LAS CONDICIONES DE HABITABILIDAD

En este trabajo, no hemos visto nada relevante referente a este aspecto, debido, a que los lugares donde se encontraban los animales del estudio, cumplían con las normas adecuadas de higiene y habitabilidad.

III.2. ESTUDIO LABORATORIAL

Hemos puesto a punto las técnicas de Elisa Indirecto e Immunoblotting, para la detección de anticuerpos.

Se han estudiado 202 sueros de distintos animales de diferentes regiones de España, tomando para Elisa tres muestras distintas de cada animal, en diferentes fechas, pero todas ellas, dentro de los cuatro primeros meses del año 1989, a excepción de los sementales de Jerez de la Frontera (Cadiz), que por tener que salir en esas fechas de "parada", solamente pudimos recoger dos muestras.

III.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS POR ELISA INDIRECTO

El valor del control positivo para esta técnica, lo obtuvimos realizando la media de las densidades ópticas (D.O.), leídas a 492 nm., de los sueros utilizados como controles positivos, siendo este valor de 1,883 nm.

De igual forma, se realizó la obtención del valor del control negativo, pero con los sueros empleados para dicho efecto en este trabajo, siendo su valor de 0,553 nm..

La diferencia en D.O., existente entre los valores de los controles positivo y negativo, es de 1,330 nm., siendo éste un buen margen de diferencia colorimétrica entre ambos.

Los resultados obtenidos de los distintos grupos de animales (potros, yeguas y sementales) en sus diferentes regiones son:

III.3.1.3. POTROS

Atendiendo a las regiones en donde se encuentran, tenemos:

Región fría y húmeda

El número total de potros estudiados en esta región, fué de 16, los cuales se encontraban en los siguientes lugares:

- Yeguada Militar de Cordovilla la Real (Palencia):
12 potros.
- Yeguada Militar de Lore-Toki (San Sebastian):
4 potros.

Región cálida y seca.

En esta región se estudiaron 35 potros, todos ellos de Jerez de la Frontera (Cadiz).

Las características de estos animales, tanto de la región fría como de la cálida, se manifiestan en el apartado II-4.

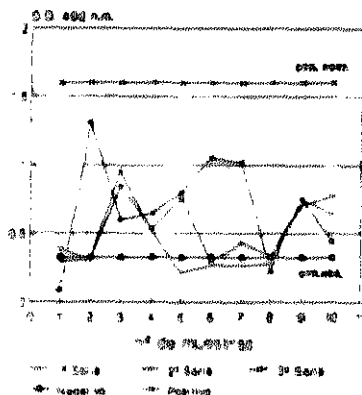
• Ninguno de estos animales han sido vacunados de Rinoneumonitis equina, pero si de Tétanos e Influenza, los de Cordovilla la Real (Palencia) y los de Lore-Toki (San Sebastian) y solamente de Influenza los de Jerez de la Frontera (Cadiz).

• Respecto a la edad, los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que en la mayoría de los casos, el aumento de la edad en los potros, va unido a la elevación de los anticuerpos frente a la Rinoneumonitis equina.

• Los valores obtenidos en D.O., de los potros estudiados en Cordovilla la Real (Palencia), tienen índices de anticuerpos frente a la enfermedad, llegando en alguna muestra, a ser altos. Este es el caso del animal nº2, que su tercera muestra presenta un valor de (1,316), próximo al valor dado para el control positivo (1,547).

Se observa que por lo general, la tercera muestra en casi todos los animales, es la que presenta valores más elevados. (Gráfico nº1)

ELISA INDIRECTO CORDOVILLA REAL-PALENCIA



POTROS

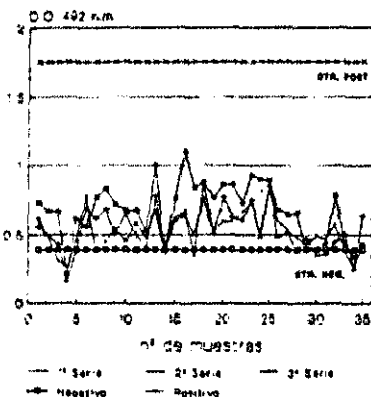
1ª SERIE
 2ª SERIE
 3ª SERIE

Graf. nº1. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en los potros de Cordovilla la Real (Palencia), leídos a 492 nm.

Los valores obtenidos de las tres muestras de cada potro, estudiados en Jerez de la Frontera (Cadiz), se encuentran casi todos, entre la banda de valores, dados al control negativo (0,396) y el valor de 1,100. Habiendo no obstante dos animales n°4 (0,213) y n°34 (0,286), cuyos valores medios están por debajo del valor dado al control negativo. También en este caso se observa, que los valores de la tercera muestra son los más elevados.

En el gráfico n°3, vemos que los animales que tienen valores más altos, por lo general, suelen ser los de mayor edad (3 y 4 años).

ELISA INDIRECTO JEREZ DE LA FRONT. (CADIZ)



Graf. n°3. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en los potros de Jerez de la Frontera (Cadiz), leídos a 492 nm.

POTROS

2586

10 HORAS 16/1/99
 14 HORAS 7/1/99
 24 HORAS 26/1/99

La media de valores, en D.O., obtenidos en potros, por Elisa indirecto en las distintas regiones estudiadas, nos indican que los potros de Lara-Teki (San Sebastian) son los que tienen valores más elevados (0.949), siendo este resultado erróneo, ya que este valor es alto por los sueros nº5 y nº6, cuyas dos primeras muestras son muy altas y que anteriormente estudiamos. El resto de los sueros de esta localidad, tienen los valores más bajos, ya que como hemos dicho, estos animales son los de menor edad de todos los potros estudiados. Los valores medios obtenidos en Jerez de la Frontera (Cadiz) y Cordivilla la Real (Palencia), son respectivamente de, 0,585 y 0,565. (Figura nº2)

COMPARACION DE VALORES POR ELISA INDIRECTO SEGUN ACTITUD

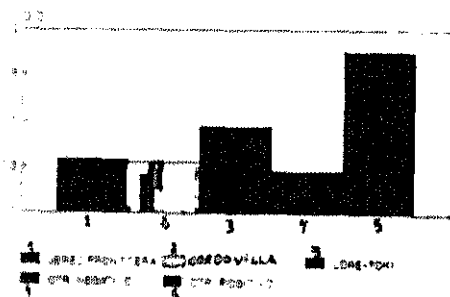


Fig. nº2

Fig. nº2. Valores medios por Elisa indirecto, de los potros estudiados en las diferentes regiones de España, leídos D.O. a 492 nm.

XII.2.1.b. YEGUAS

El estudio de las yeguas, lo realizamos en dos zonas climatológicamente opuestas, estas son:

Región fría y húmeda.

El total de yeguas estudiadas en esta región, fué de 11, todas ellas localizadas en Cordovilla la Real (Palencia).

Región cálida y seca.

El número de yeguas estudiadas en esta región, fué de 38, todas ellas se encontraban localizadas en Jerez de la Frontera (Cadiz).

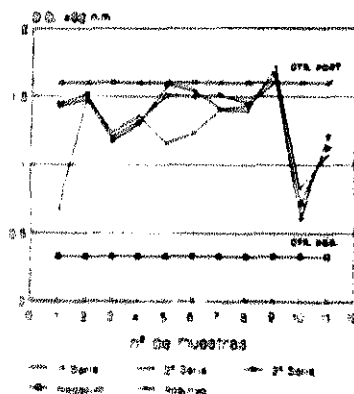
Las características de estos animales, se observan en el apartado II-4.

* A la hora de referirnos al cuadro de vacunaciones en estos animales, hay que destacar, que los que se encuentran en Cordovilla la Real (Palencia), están vacunados de Rinoneumonitis equina, dos y tres meses antes de la primera toma de muestra. Esto es importante, ya que a la hora de valorar los índices de anticuerpos frente a la enfermedad, nos saldrán valores bastante altos. También, estos animales están vacunados de Tétanos e Influenza. Sin embargo, los animales de Jerez de la Frontera (Cadiz), solo están vacunados de Influenza.

Los valores que apreciamos en Cordovilla la Real (Palencia), leídos en D.O. a 492 nm., son altos, estando próximos al control positivo (1,587), e incluso alguno, como la yegua nº9, de 11 años, que supera dicho control, con un valor de 1,668.

Un dato que cabe resaltar, es la yegua nº10, de 10 años, que tiene en sus tres muestras, los valores más bajos, de los animales estudiados en esta localidad, siendo su media de 0,727, y habiendo sido vacunada en Octubre de 1988, es decir, tres meses antes de tomar la primera muestra. Respecto al resto de los animales, los valores obtenidos en sus distintas muestras, no presentan ningún dato relevante. (Gráfica nº4)

ELISA INDIRECTO CORDOVILLA REAL-PALENCIA



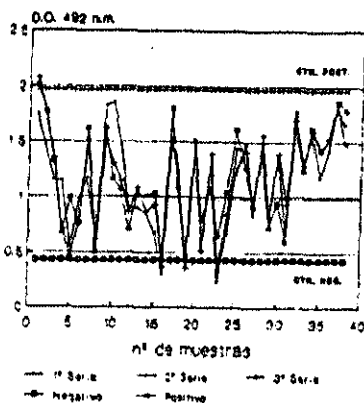
YEGUAS

FECHA DE MUESTREO	YEGUA	VALORES DE ABSORCIÓN	
		1ª Serie	2ª Serie
10/03/00	10	0.51	0.51
11/03/00	11	0.51	0.51
12/03/00	12	0.51	0.51
13/03/00	13	0.51	0.51
14/03/00	14	0.51	0.51
15/03/00	15	0.51	0.51
16/03/00	16	0.51	0.51
17/03/00	17	0.51	0.51
18/03/00	18	0.51	0.51
19/03/00	19	0.51	0.51
20/03/00	20	0.51	0.51
21/03/00	21	0.51	0.51
22/03/00	22	0.51	0.51
23/03/00	23	0.51	0.51
24/03/00	24	0.51	0.51
25/03/00	25	0.51	0.51
26/03/00	26	0.51	0.51
27/03/00	27	0.51	0.51
28/03/00	28	0.51	0.51
29/03/00	29	0.51	0.51
30/03/00	30	0.51	0.51

Graf. nº4. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en las yeguas de Cordovilla la Real (Palencia), leídas a 492 nm.

Los índices de anticuerpos obtenidos en las yeguas de Jerez de la Frontera (Cádiz), presentan en algunos casos relación con la edad, aumentando éstos cuando la edad es mayor. Así, observamos que los valores, en D.O., de los animales: nº1 de 9 años, (1,945); nº17 de 10 años, (1,693); nº32 de 15 años, (1,710) y el nº37 de 13 años, (1,848), están próximos al valor dado al control positivo (1,974). (Gráfica nº5)

ELISA INDIRECTO JEREZ DE LA FRONT. (CADIZ)



YEGUAS

Fecha

1ª Serie 16/1/89
2ª Serie 17/1/89
3ª Serie 28/1/89

Graf. nº5. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en las yeguas de Jerez de la Frontera (Cádiz), leídos a 492 nm.

La media de los valores, de las yeguas estudiadas en ambas poblaciones, no varía mucho, pero sí hay una ligera superioridad, en los animales de Cordovilla la Real (Palencia), con un valor medio de 1,115, debido a que están vacunados de Rinoneumonitis equina. Mientras que los animales de Jerez de la Frontera (Cádiz), tienen un valor medio de 1,167. (Figura nº3)

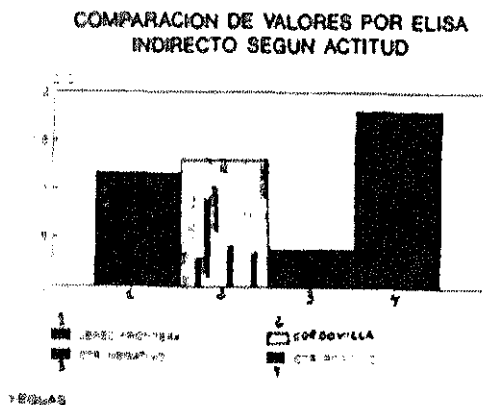


Fig. nº3. Valores medios por Elisa indirecto, de las yeguas estudiadas en las diferentes regiones de España, leídas en D.O. a 492 nm.

III.2.1.2 SEMENTALES

También en los sementales distinguimos tres regiones climáticas distintas, como son:

Región fría y húmeda.

El número de animales estudiados en esta región fué de 43, repartidos en los siguientes lugares:

- * Lore-Toki (San Sebastian) ----- 8 animales.
- * Zaragoza ----- 35 animales.

Región de clima intermedio.

En esta región, estudiamos 24 sementales, todos ellos pertenecientes a Alcalá de Henares (Madrid).

Región cálida y seca.

Aquí se estudiaron 35 sementales, los cuales todos pertenecían a Jerez de la Frontera (Cádiz).

Las características de estos animales, se observan en el apartado II-4.

* El calendario de vacunaciones de estos animales, es variable. Los animales de Alcalá de Henares (Madrid), están vacunados de Rinoneumonitis equina, en Diciembre de 1988, es decir, un mes antes de realizar la primera toma de muestras. También, estos animales están vacunados de Influenza.

Los animales de Lore-Toki (San Sebastian), están vacunados de Influenza y Tétanos. Y los de Zaragoza y Jerez de la Frontera (Cádiz), solamente están vacunados de Influenza.

* La relación en sementales, de los valores de Elisa indirecto respecto a la edad, es algo diferente a la observada en los potros y yeguas.

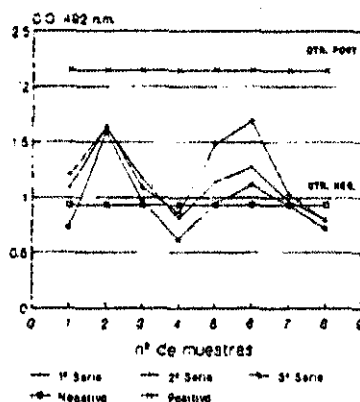
En terminos generales los resultados obtenidos, oscilan entre los valores dados a los controles, a excepci3n de los animales de Alcal3 de Henares (Madrid), que sus valores est3n pr3ximos al d3do para el control positivo (1,965), e incluso algunos est3n por encima de 3sto, por estar vacunados de Rinoneumonitis equina.

Si apreciamos alguna caracteristica nueva, como es la de que animales con edades entre 13 y 23 a3os, sus valores medios bajan considerablemente, en algunos casos, como en el n34 de Lore-Toki de 22 a3os (0,769), el n311 de Zaragoza de 14 a3os (0,366) y el n313 de Jerez de la Frontera de 23 a3os (0,480).

Las segundas muestras obtenidas en los sementales de Lore - Toki (San Sebastian), presentan los valores m3s altos, obtenidos en esta localidad. Tambi3n apreciamos que hay varios animales que est3n por debajo del valor dado al control negativo, como es el caso del n34 de 22 a3os, cuyas series est3n por debajo del control negativo (0,931), tambi3n el n37 de 11 a3os, cuyo valor medio, es de 0,981, estando pr3ximo al valor del negativo y el n33 de 8 a3os, que presenta un valor medio de 0,775, es decir por debajo del control negativo.

El resto de animales, presentan valores predecibles para la edad y condiciones que se encuentran. (Graf.n36)

ELISA INDIRECTO LORE-TOKI (S.SEBASTIAN)



SEMENTALES

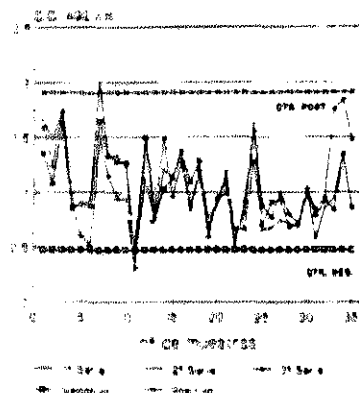
FORMA

XXX DE XXXXXXX 1ª SERIE 11/1/99
2ª SERIE 12/1/99
3ª SERIE 14/1/99

Graf. nº6. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en los sementales de Lore-Toki (San Sebastian), leídos a 492 nm.

Los sementales de Zaragoza, se encuentran todos entre los valores, en D.O., dados al control positivo (1,910) y al control negativo (0,474). No se aprecia nada significativo en sus valores, a excepción del animal nº11, que presenta un valor medio de 0,164, estando éste por debajo del control negativo. Siendo el resto de los valores, razonables respecto a su edad y características. (Graf. nº7)

ELISA INDIRECTO ZARAGOZA



SEMENTALES

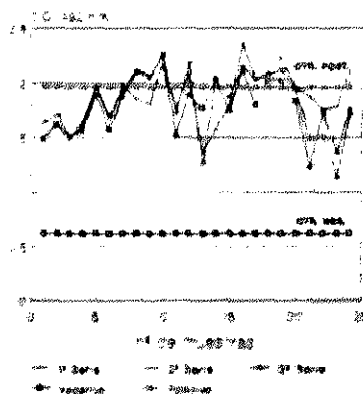
1972

1º SEME 12/3/70
2º SEME 20/3/70
34 SEME 20/3/70

Graf. nº7. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en los sementales de Zaragoza, leídos a 492 nm.

Los sementales de Alcalá de Henares, alcanzan valores, en D.O., muy altos, siendo varios los que superan el valor del control positivo (1,965), debido a que han sido vacunados de Rinopneumonitis equina, en fechas próximas al de recogida de la primera toma de muestras. No obstante, hay algunos animales de éstos, que presentan valores algo bajos, como el nº13 (1,470), el nº21 (1,510) y el nº23 (1,429). (Graf. nº8).

ELISA INDIRECTO ALCALÁ DE HENARES-MADRID



SEMENTALES

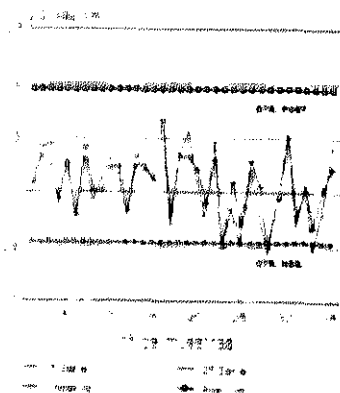
Fecha de nacimiento: 1982
 Fecha de muestra: 1982

Graf. nº8. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en los sementales de Alcalá de Henares (Madrid), leídos a 492 nm.

En los sementales de Jerez de la Frontera (Cádiz), cabe resaltar, que se encuentran los animales de mayor edad del estudio, como se demuestra en el apartado II-4 y que como hemos mencionado anteriormente, presentan alguno de estos animales una disminución de los valores obtenidos en D.O. Así, tenemos que el animal nº11, tiene 13 años y un valor medio de 0,504; el nº28, tiene 23 años y un valor medio de 0,480. Los valores de los demás animales, son lógicos respecto a la edad y condiciones en las que se encuentran.

En esta región, cabe destacar que sólo pudimos realizar la recogida de dos muestras, debido, a que los animales se encontraban de parada, cuando intentamos recoger la tercera muestra. (Graf. nº9)

ELISA INDIRECTO JEREZ DE LA FRONT. (CADIZ)



Graf. nº9. Valores por Elisa indirecto, de las muestras obtenidas en los sementales de Jerez de la Frontera (Cádiz), leídos a 492 nm.

SEMENTALES

FECHA
20-08-80 20/8/80
21-08-80 21/8/80

Cuando realizamos la media de los valores, en D.O., obtenidos por Elisa indirecto, en las distintas regiones estudiadas para los sementales, apreciamos, que el valor medio obtenido en los animales de Alcalá de Henares (Madrid), es de 1,822, siendo éste muy superior al resto de los valores medios de las demás regiones y aproximándose al dado, para el control positivo (1,965 nm.). Este hecho, es debido a que los animales de Alcalá de Henares, están vacunados de Rinoneumonitis equina, en fechas próximas a la toma de muestras. El resto de los animales, de las regiones restantes, tienen valores próximos entre ellos y así tenemos, que el valor medio de los sementales de Lore-Toki (San Sebastian) es de 1,100; el de Jerez de la Frontera (Cadiz), es de 1,074 y el de Zaragoza, es de 1,041. (Figura nº4)

COMPARACION DE VALORES POR ELISA INDIRECTO SEGUN ACTITUD

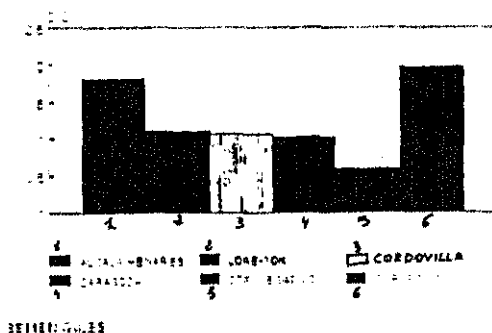


Fig.nº4. Valores medios por Elisa indirecto, de los sementales estudiados en las diferentes regiones de España, leídos en D.O. a 492 nm.

III.3.1.4. COMPARACION DE VALORES POR ELISA ENTRE LOS SUEROS POSITIVOS - NEGATIVOS Y VACUNADOS

A la hora de comparar los resultados obtenidos entre los sueros positivos (por enfermedad y vacunados) y negativos, observamos que el valor dado a los sueros vacunados, va ha tener mucha relación con la fecha de vacunación, ya que si ésta es próxima a la de recogida de muestras, se acercará al valor del positivo, mientras que disminuirá este valor, contra más se alejen estas fechas entre sí.

El valor medio de los animales vacunados, se obtuvo de las yeguas de Cerdovilla la Real (Palencia) y los sementales de Alcalá de Henares (Madrid). Estando estos animales vacunados entre uno y dos meses antes de la primera toma de muestra.

La media de valores recogidos en este trabajo es, para el suero positivo de 1,883 nm., para el suero vacunado de 1,568 nm. y para el suero negativo de 0,553 nm.. Estos resultados se expresan en la fig.nº5.

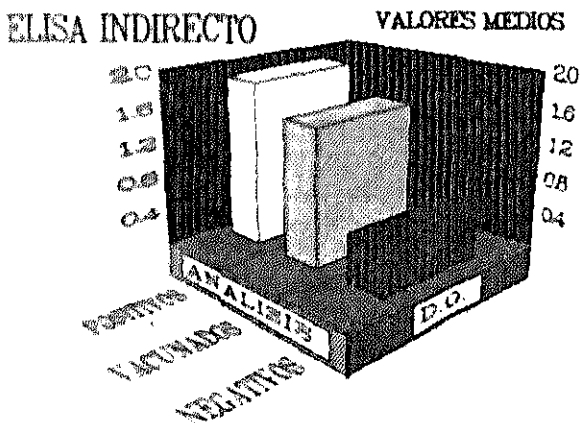


Fig.nº5. Valores medios, leídos en D.O. a 492 nm., de los sueros positivos, vacunados y negativos.

III.2.2. EVALUACION DEL ELISA INDIRECTO CON LA TECNICA DE SERONEUTRALIZACION

Para evaluar la técnica de Elisa indirecto, puesta a punto por nosotros, para el diagnóstico de Rinoneumonitis equina, utilizamos la Seroneutralización como técnica de referencia, dando a ésta como valor positivo, a partir de un título de 1/16, que es la dilución óptima obtenida en nuestro trabajo.

Esta técnica, la hemos efectuado con todos los sueros recogidos en la primera toma de muestras.

III.2.3. COMPARACION DE RESULTADOS ENTRE LAS TECNICAS DE ELISA INDIRECTO Y SERONEUTRALIZACION

Realizamos los cálculos matemáticos para valorar la sensibilidad y especificidad, obteniendo los siguientes resultados:

SERONEUTRALIZACION ++ (1/16)

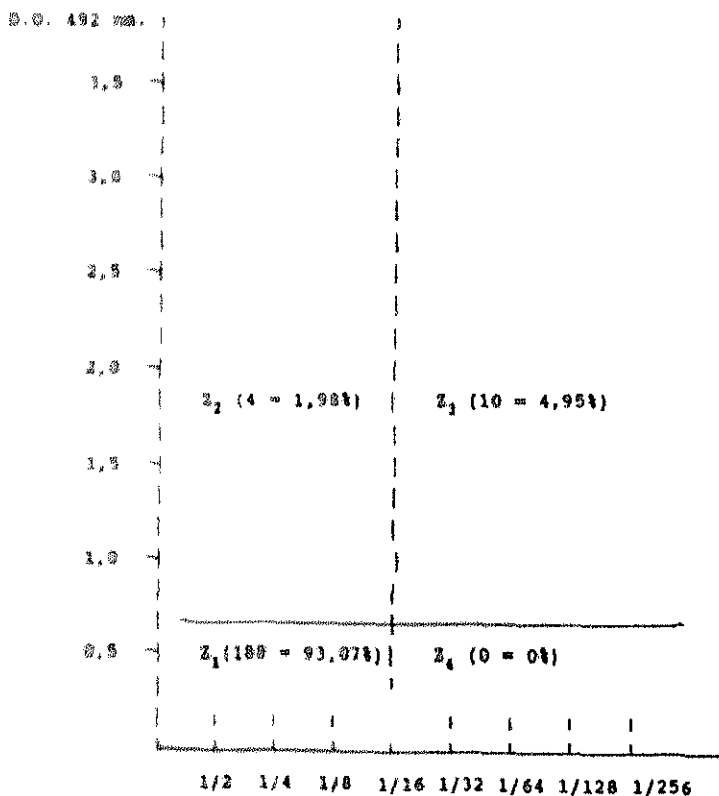
	+	-
D.O. 492 nm.	a	c
E		
L +		
I	10	4
S		
A	b	d
1		
1,9 nm. -	0	188

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a+b} \cdot 100 = \frac{10}{10+0} \cdot 100 = 100\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{d+c} \cdot 100 = \frac{188}{188+4} \cdot 100 = 97,9\%$$

También hemos estudiado los resultados, siguiendo el método de Fallerin y col. (1980), exponiendo los resultados obtenidos para cada suero, en una tabla a doble entrada, subdividida en zonas para los valores de corte de ambas técnicas comparadas, así el valor de corte para Elisa, es el dado a la media de los controles negativos (0.55) y el de la Seroneutralización es de 1/16.

ELISA.-



Diluciones.
SERONEUTRALIZACION.-

Z_1 = Sueros negativos por las dos técnicas.

Z_2 = Sueros positivos por ELISA y negativos por S.N.

Z_3 = Sueros positivos por las dos técnicas.

Z_4 = Sueros positivos por S.N. y negativos por ELISA.

III.2.4 ANALISIS DE PROTEINAS

En el estudio cinético de las proteínas estructurales y de infección, observamos la aparición de éstas en un ensayo de post-infección, desde las 0 horas hasta las 28 horas, utilizando geles de Acrilamida al 12% y 17%, para así poder apreciar, las diferentes proteínas con pesos moleculares altos y bajos y comprobando a la vez, cual era el orden de aparición entre ellas. (Foto nº6)

ESTUDIO DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES Y DE INFECCIÓN

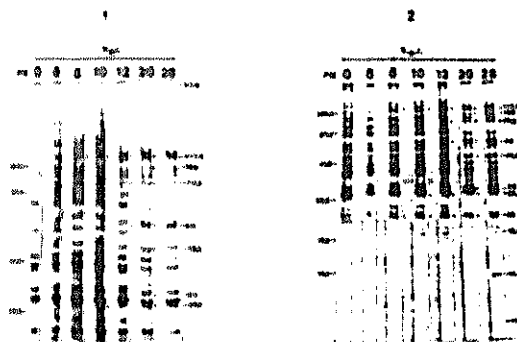


Foto n°6. Estudio cinético entre las 0 y las 28 horas, de las proteínas estructurales y de infección, realizado en geles de Acrilamida al 12% (1) y al 17% (2).

PM.) Patrón de pesos moleculares

- 1.) Concentración del gel utilizado en la electroforesis, al 12% de acrilamida.
- 2.) Concentración del gel utilizado en la electroforesis, al 17% de acrilamida.

A lo largo del ensayo distinguimos 12 proteínas estructurales y de infección del virus, con pesos moleculares que oscilaban entre 230 Kd y 11,8 Kd. Las primeras que aparecieron fueron a las 8 horas post-infección, siendo sus pesos moleculares de 117,5 Kd y 23 Kd; más tarde a las 10 horas apareció otra con un peso molecular de 79,5 Kd; a las 12 horas aparecieron las de 230 Kd, 79,5 Kd y 95 Kd; a las 20 horas las de 100 Kd, 46,5 Kd y 33 Kd; y a las 28 horas aparecieron las de 18,8 Kd, 14,8 Kd y 11,8 Kd.

III.2.5 INMUNORREACION SOBRE FILTROS DE NITROCELULOSA. IMMUNOBLOTTING

Los datos del análisis de proteínas estructurales y de infección, fueron de gran interés para la puesta a punto de la técnica de Immunoblotting.

Todas las proteínas anteriormente citadas, reaccionan con el pool de sueros controles positivos. (Foto nº7)

Por el contrario, no apareció ninguna reacción, cuando estas proteínas las enfrentamos con un pool de sueros controles negativos. (Foto nº8)

CONTROL POSITIVO

— 230
— 117,5
— 100
— 78,5
— BSA
— 55
— 48,5
— 33
— 29,5
— 23
— 18,8
— 14,8
— 11,8

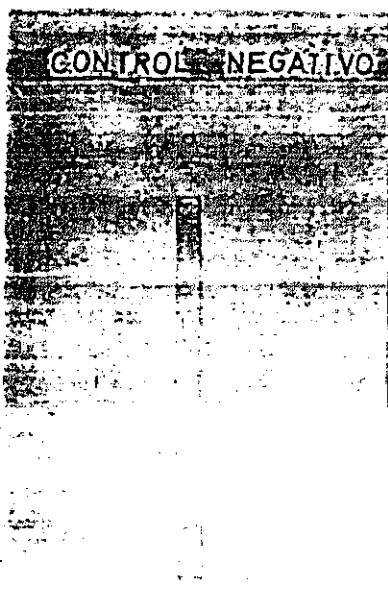


Foto nº7. Proteínas aparecidas,
en un suero control positivo.

Foto nº8. Proteínas aparecidas,
en un suero control negativo.

Una vez adaptadas las condiciones idóneas para la técnica, se estudiaron 10 sueros de animales de la primera toma de muestras de la experiencia, distribuidos en 10 muestras para cada aptitud (potres, yeguas y sementales), de las diferentes regiones climáticas y con valores distintos encontrados por Elisa.

En los resultados obtenidos, encontramos diferencias por edades y si estaban o no vacunados de Rinoneumonitis equina.

Para llevar a cabo dicho estudio, seleccionamos los siguientes animales:

III.2.1.1.1. POTROS Ninguno estaba vacunado de Rinoneumonitis equina, por lo que el estudio lo encaminamos a comparar, las diferentes proteínas de infección, según las edades.

Aquí tomamos, cinco muestras de una población de animales menores de un año y otras cinco muestras de otra población de animales mayores de un año.

En los animales menores de un año, no aparece ninguna proteína, al compararlos con un pool de sueros controles positivos. (Foto nº9)

Sin embargo, los potros superiores al año, al compararlos con el pool de sueros del control positivo, aparecieron con poca heterogeneidad, proteínas cuyos pesos moleculares son: 29,5 Kd; 46,5 Kd; 93 Kd y 117,5 Kd. (Foto nº10)

POTRO

Procedencia: San Sebastián
 Vacunaciones: Influenza y Tetano (5-69)
 Raza: Pura Sangre Inglés
 Edad: 9 meses



Foto nº9. No hay reacción de proteínas, en animales menores de un año.

POTRO

Procedencia: Cádiz
 Vacunaciones: Influenza (6-68)
 Raza: Pura Raza Española
 Edad: 4 años

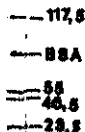


Foto nº10. Aparición de proteínas, en animales mayores de un año.

XII.2.3.b. YEGUAS. Al tener estos animales edades adultas, todos presentan reacción inmunológica con las proteínas estructurales y de infección, pudiendo comparar éstas, con la de los potros mayores de un año.

No obstante, en este caso hemos enfocado el estudio, hacia los animales vacunados de Rinoneumonitis equina, para poder comparar sus sueros con los de los animales de edad adulta y los sueros positivos.

En las yeguas no vacunadas de Rinoneumonitis equina, aparece inmunoreacción con las proteínas cuyos pesos moleculares son: 29,5 Kd; 46,5 Kd; 55 Kd; 100 Kd y 117,5 Kd. (Foto nº11)

En las yeguas vacunadas de Rinoneumonitis equina, aparecen bandas con las proteínas cuyos pesos moleculares son: 29,5 Kd; 46,5 Kd; 55 Kd; 79,5 Kd; 100 Kd y 117,5 Kd. (Foto nº12)

En los sueros de animales vacunados de Rinoneumonitis equina, aparece una banda en la proteína de peso molecular de 79,5 Kd. que no aparece en las yeguas no vacunadas.

YEGUA

Procedencia: Cadiz

Vacunaciones: Influenza (6-88)

Raza: Pura Raza Española

Edad: 5 años



Foto n.º 11. Proteínas de
infección, en yeguas no
vacunadas.

YEGUA

Procedencia: Valencia

Vacunaciones: Influenza (6-88), Pura Raza Española

Raza: Breton

Q-88

Edad: 11 años



Foto n.º 11. Proteínas de
infección, en yeguas si
vacunadas.

III.2.1.2. GENERALIDAD. En los sementales, al igual que en las yeguas, al ser animales adultos, todos presentan reacción con las proteínas estructurales y de infección, por éso el estudio lo hemos enfocado también, sobre los animales vacunados o no de Rinopneumonitis equina.

En los sementales que no estaban vacunados de Rinopneumonitis equina, se observa inmunorreacción con proteínas cuyos pesos moleculares son: 11 Kd; 29,5 Kd y 55 Kd. (Foto nº13)

En los sementales vacunados de Rinopneumonitis equina, se aprecian las proteínas, cuyos pesos moleculares son: 18,6 Kd; 23 Kd; 29,5 Kd; 40,5 Kd; 55 Kd; 79,5 Kd; 100 Kd y 117,5 Kd. (Foto nº14)

SEMENTAL

Procedencia: Zaragoza
 Vacunaciones: Influenza (2-89)
 Raza: Hispano Breton
 Edad: 14 años



Foto n°13. Proteínas de
 infección, en sementales
 no vacunados.

SEMENTAL

Procedencia: Madrid
 Vacunaciones: Influenza (83, 84, 85, 86, 87, 88)
 Raza: Pura Raza Española
 Edad: 8 años



Foto n°14. Proteínas de
 infección, en sementales
 si vacunados.

En los animales vacunados un mes antes de la primera toma de muestra, no se apreciaban las proteínas de pesos moleculares : 11,6 Kd; 14,8 Kd; 33 Kd y 110 Kd, que sí aparecen en los sueros de los animales enfermos. Sin embargo, el resto de proteínas sí aparecen, disminuyendo el número de éstas y su intensidad, según vaya transcurriendo el tiempo de vacunación.

III.1.6 COMPARACION DE RESULTADOS ENTRE LAS TÉCNICAS DE ELISA INDIRECTO E IMMUNOBLOTTING

Los valores obtenidos por Elisa indirecto, para sueros de animales menores de un año, son en su mayoría inferiores al valor dado al control negativo, estos mismos sueros los analizamos por Immunoblotting y no apreciamos ninguna reacción de proteínas en ellos. En este caso, ambas técnicas coinciden en sus resultados.

Si ahora valoramos los sueros de los potros mayores de un año, por Elisa indirecto, obtenemos ligeros aumentos, pero todos ellos próximos al valor dado al control negativo, si con los sueros de estos potros mayores de un año, realizamos un Immunoblotting y los hacemos comparar con el pool de sueros controles positivos, nos aparecen proteínas de pesos moleculares de: 29,5 Kd; 46,5 Kd; 55 Kd y 117,5 Kd.

En los animales adultos vacunados, los resultados ofrecidos por Elisa indirecto, son bastante altos e incluso alguno, hemos visto que es superior al del control positivo. Todo esto, está relacionado con la proximidad que haya entre las fechas de vacunación y de recogida de muestras, siendo estos valores más altos, cuanto más próxima estén las dos fechas anteriormente mencionadas. En estos animales el Immunoblotting, varía también según la proximidad de la fecha de vacunación, con respecto a la fecha de toma de muestra. Así, hemos comprobado que animales adultos vacunados de uno a tres meses antes de la toma de muestra, al compararlos con un pool de sueros controles

positivos, aparecían proteínas de pesos moleculares de: 79,5 Kd; 46,5 Kd; 55 Kd; 79,5 Kd; 100 Kd y 117,5 Kd. La variación, la encontramos en los sueros cuya fecha de vacunación ha sido un mes anterior a la toma de muestra, apareciendo además de las proteínas anteriormente mencionadas, las proteínas de peso molecular de : 18,8 Kd y 21 Kd.

Lo que sí se aprecia, es que estos sueros de animales adultos y vacunados un mes antes de la toma de muestras, no aparecen las proteínas de peso molecular de: 11,8 Kd; 14,8 Kd, 39 Kd y 210 Kd, que son propias de animales enfermos.

IV - DISCUSSION

IV-1 SITUACION DE LA RINONEUMONITIS EQUINA EN ESPAÑA

La Rinoneumonitis equina es una enfermedad extendida por todo el mundo, pero controlada en la mayoría de los países, sobre todo de la CE. En España, debido a la falta de buenas técnicas de diagnóstico que nos pudieran ofrecer una situación epizootiológica de la enfermedad, así como la falta de estudio de factores que pudieran tener relación con ella, hace que se desconozca su incidencia y localización, apareciendo esporádicamente brotes en sus distintas manifestaciones.

En este trabajo, hemos tratado de cubrir este espacio vacío anteriormente citado, estudiando los posibles factores que pudieran influir en el desarrollo de la enfermedad, así como poniendo a punto, un Elisa indirecto y un Immunoblotting, que fueran lo suficientemente rápidos y sensibles como para poder llevar a cabo estudios serológicos masivos.

Hemos estudiado animales de diferentes regiones de España y de diversas características, las cuales hemos tenido en cuenta a la hora de valorar el trabajo. Estas características, son: el clima, la edad, el peso, el sexo, la raza y las condiciones de habitabilidad y que al igual que Campbell y Studdert(1983), creemos que pueden tener gran importancia en el desarrollo de la enfermedad.

Los resultados serológicos obtenidos en este trabajo, nos han llevado a pensar, que la incidencia de la enfermedad en nuestro país es muy alta, ya que en la mayoría de los estudios serológicos realizados han sido positivos, observando anticuerpos frente a la enfermedad.

El hecho de haber realizado tres periodos de muestreo, en tiempos diferentes, nos ha permitido conocer la posible evolución de los anticuerpos y de las distintas formas clínicas. Durante todo el trabajo, no se presentó ninguna manifestación clínica, pero se mantuvieron los niveles de anticuerpos detectados por

Elisa indirecto e Immunoblotting, indicándonos que la mayoría de los animales estudiados, ha tenido contacto con el virus.

Esto pone de manifiesto, el riesgo que potencialmente existe en nuestro país, de que se produzca una reactivación de la enfermedad, ya que el número tan elevado de casos asintomáticos crónicos, hace que en cuanto se modifiquen algunas de las características específicas y ambientales estudiadas en estos animales, pueda desencadenarse, algunas de las distintas manifestaciones patológicas de esta enfermedad.

IV-2. CARACTERÍSTICAS ESTUDIADAS

* Respecto a las características del CLIMA, RAZA, SEXO Y PESO, no hemos apreciado ninguna variación significativa, que pudiera relacionarse con el desarrollo de la enfermedad. Ya que animales con diferencias en estas características, mantienen valores similares de niveles de anticuerpos, tanto por Elisa como por Immunoblotting.

* No ocurre lo mismo con la EDAD, ya que hemos apreciado variabilidad en los resultados serológicos, aumentando el nivel de positividad por lo general, con la misma. Lo que nos sugiere, que al aumentar la edad, aumenta la posibilidad de contagio. Un hecho que nos llama la atención en algunos sementales adultos, es la disminución de los índices de anticuerpos.

* Normalmente en los potros, los valores que hemos obtenido en los sueros de la tercera muestra, suelen ser los más elevados, como se aprecia en las gráficas nº1 y nº3, de las localidades de Cordovilla la Real (Palencia) y Jerez de la Frontera (Cádiz). No obstante, de estas dos localidades, los potros de Cordovilla la Real (Palencia), tienen valores superiores a los de Jerez. Esto puede ser debido, a que las yeguas de Cordovilla la Real, están vacunadas de Rinoneumonitis equina.

También se aprecia que el potro nº2 de Cordovilla la Real, presenta un valor en su tercera muestra de 1,116, próximo al dado al control positivo (1,587). Esto puede ser debido a que es uno de los de mayor edad estudiados en esa zona (2 años).

Otro aspecto significativo, es lo que ocurre con los potros de Lore - Toki (San Sebastián), debido a que su tercera muestra es la que presenta los valores más bajos, como se demuestra en el gráfico nº2, pudiendo esto deberse a una ligera infección con cuadro clínico poco manifiesto.

* En las yeguas, los valores obtenidos en Cordovilla la Real (Palencia), son muy altos e incluso alguno como el nº9, está por encima al dado para el control positivo. Esto es debido a que estos animales han sido vacunados en fechas próximas a la recogida de muestras. No obstante, apreciamos en el gráfico nº4, que los valores de las tres muestras de esta localidad, están bastante próximos, a excepción de las yeguas nº5 y nº6, cuyos valores en sus primeras muestras, fué inferior a los valores de las otras dos. También observamos como las yeguas nº10 y nº 11 tienen unos valores muy bajos, a pesar de estar vacunadas de Rinoneumonitis equina. Esto creemos que puede ser debido, a que la vacuna no les haya producido una buena respuesta.

En las yeguas de Jerez de la Frontera (Cadiz), vemos en la gráfica nº5, como los valores obtenidos se manifiestan en forma de dientes de sierra, entre los valores dados a los controles positivo y negativo. Esta variabilidad, puede ser debida a las distintas formas de respuesta de anticuerpos observada en la vacunación, frente a esta enfermedad (Dutta y Shipley 1975).

No obstante, en la figura nº3, se aprecia que hay poca diferencia de valores en las yeguas, entre las localidades estudiadas, apesar de estar las yeguas de Cordivilla la Real (Palencia) vacunadas de Rinoneumonitis equina. La explicación a esto, debe ser relacionada con una respuesta inmune pobre a la vacuna de estos animales.

* En los sementales, los valores de Elisa obtenidos según las gráficas nº6, 7, 8 y 9, manifiestan que la tercera muestra por lo general, alcanza valores intermedios o bajos, respecto a las otras dos muestras tomadas. Quizas esto pudiera ser como consecuencia a que tuvieran un cuadro clínico no muy manifiesto y están en proceso de recuperación.

Los sementales de Alcala de Henares (Madrid), son los que tienen valores más elevados, ya que sus tomas de muestra fueron realizadas en fechas próximas a la vacunación de Rinoneumonitis equina. Los sementales de las otras regiones, presentan valores en dientes de sierra, entre los valores dados a los controles positivo y negativo, creyendo que es por el mismo motivo que en las yeguas.

* Respecto al suero de los animales vacunados, no hemos apreciado ninguna reacción cruzada con nuestro antígeno, a excepción lógica de los vacunados de Rinoneumonitis equina, que evidentemente aumentan sus valores de anticuerpos, en el desarrollo de las mismas. Lo cual demuestra, que tanto el antígeno utilizado, como los métodos puestos a punto, son lo suficientemente específicos como para no presentar reacciones cruzadas con el antígeno de Tétanos e Influenza equina.

* Por último, las CONDICIONES DE HIGIENE Y HABITABILIDAD, no han influido en nuestro caso, ya que los locales en donde se encontraban los animales estudiados, estaban en buenas condiciones.

Este punto es importante, ya que una de las vías de contagio de la enfermedad, es por contacto, bien directo o ambiental, pudiendo influir en su desarrollo.

IV-3 VALORACION DE LAS TECNICAS DE TRABAJO

La puesta a punto de las técnicas de Elisa indirecto e Immunoblotting, ha sido otro de los objetivos de este trabajo y nos ha permitido realizar el seguimiento de la enfermedad, en nuestro país.

Una cosa a tener en cuenta, es el control positivo utilizado en el estudio, ya que se obtuvo de animales que presentaban un cuadro clínico respiratorio y nervioso, en fase aguda. Por lo tanto, se podría decir que no es válido como control para animales, que padecieran o hubieran padecido, Rinoneumonitis equina con síndrome abortivo. No obstante, al igual que Allen (1983), creemos, que si hubieramos estado ante un caso de cuadro clínico abortivo, lo hubieramos detectado igualmente, ya que compartimos con los anteriores autores citados, la idea de que la variación existente entre los subtipos 1 y 4, es aparentemente funcional. También, compartimos la opinión de Allen (1983) y Studdert (1984), de que el virus productor de todos los cuadros clínicos es el mismo, pero, dependiendo de donde evolucione, presentará un cuadro clínico diferente.

* La técnica de ELISA INDIRECTO, la evaluamos respecto a la Seroneutralización, que es la técnica de referencia utilizada en la actualidad para el diagnóstico de esta enfermedad. La Seroneutralización, es una técnica de fácil manejo, pero de procesamiento muy largo y no de muy alta sensibilidad, ya que nos valora solamente la aparición de anticuerpos neutralizantes (Vulcano y col 1988). No obstante, debido a la cinética de aparición de los anticuerpos neutralizantes, algo tardía en esta enfermedad, normalmente es necesario realizar pruebas de seroconversión, para ser mucho más objetivo a la hora de valorar un análisis.

La técnica del Elisa indirecto es más sensible y rápida que la Seroneutralización (Vulcano y col. 1988), pero quizás la especificidad de Elisa esté ligada al modo de preparar el

antígeno (Soula y col. 1982), aunque en nuestro caso, no hemos encontrado reacciones cruzadas contra la vacuna de Tétanos e Influenza.

No podemos diferenciar por Elisa, los anticuerpos vacunales, de los producidos por la enfermedad, ya que la vacuna utilizada se realiza con virus vivo atenuado. Así, valores superiores al control del positivo, tendríamos que ver si el animal está o no vacunado de Rinoneumonitis equina, y si está, cuando se realizó. En este último caso, es oportuno repetir la prueba con 25 días de intervalo.

El amplio abanico de valores obtenidos en los resultados, todos comprendidos en el rango marcado por los valores del control negativo y positivo, son debidos, a las diversas situaciones que el animal se ha encontrado a lo largo de su vida, entre las que se encuentran, lugares de estancia, proximidad a animales afectados por la enfermedad o vacunados y condiciones de higiene y habitabilidad.

* EL IMMUNOBLOTTING, presenta la gran ventaja de su alta especificidad, al definirnos de una manera clara la situación de las proteínas inmunoreactivas, así como de localizar sus pesos moleculares, para poderlos comparar con otras proteínas de pesos moleculares conocidos.

En nuestro trabajo hemos distinguido 12 proteínas antigénicas del ENV-1, las cuales tienen pesos moleculares parecidos a los descritos por Shimizu y col.(1989), aunque este autor hace alusión solamente a 11 proteínas antigénicas, dejando la posibilidad que hubiera alguna más.

Animales vacunados con la misma vacuna de Rinoneumonitis equina en Diciembre de 1988, presentan dos proteínas inmunoreactivas más (18,8 Kd y 23 Kd), que los vacunados en Noviembre de 1988. Esto nos hace pensar, que esas dos proteínas antigénicas, son de las primeras en ser bloqueadas por el sistema

inmune.

Sin embargo la diferencia que apreciamos entre las proteínas de inmunoreacción de un animal enfermo y un animal vacunado, se encuentra en la aparición en el enfermo de las proteínas cuyos pesos moleculares son: 11,8Kd, 14,8Kd, 33Kd y a veces la de 230Kd. Estas proteínas, son unas excelentes candidatas, como indicativas para dar un diagnóstico, diferenciando vacunación de enfermedad, aunque un mayor numero de pruebas se deberían realizar, para poder comprobar este hecho.

Todas las proteínas inmunoreactivas, son de aparición tardía en la infección, siendo la primera de ellas, la de 230Kd a las 12 horas post-infección (h.p.i.), la de 33Kd a las 20 h.p.i. y las de 11,8Kd y 14,8Kd a las 28 h.p.i..

En los animales que no padecen cuadro clínico, pero tienen anticuerpos frente al virus, aparecen menos proteínas inmunoreactivas que en los vacunados. Otra de las diferencias que hemos visto, son las proteínas inmunoreactivas que no aparecen en los animales sin cuadro clínico y sí en los animales vacunados. Estas son las de pesos moleculares de 18,8Kd y 79,5Kd.

El Immunoblotting, es una excelente técnica para estudiar los casos dudosos que por la técnica Elisa puedan surgir, ya que dada su enorme especificidad resuelve las dudas. No es sin embargo una técnica recomendada para utilizarla a gran escala, debido a lo engorroso de su elaboración, aunque no complicado. Por eso para el estudio de grandes poblaciones, recomendamos las técnicas de procesamiento rápido y sensibles, como es el Elisa, quedando el Immunoblotting para casos de comprobación dudosa, como se ha recomendado o para el estudio de pocos animales.

Es también importante destacar que el suero control positivo utilizado en este trabajo, procede de animales con enfermedad aguda, presentando valores por encima de los valores positivos medios, obtenidos en nuestro estudio serológico, ya que los positivos encontrados por Elisa indirecto e Immunoblotting,

proceden de animales asintomáticos. Quizas, para realizar estudios serológicos masivos, y ante la experiencia de este trabajo, sería recomendable incorporar como control positivo, valores de estos últimos animales, ya que se daría, una imagen más real de la situación epizootiología.

Finalmente resaltar que en el estudio realizado, hemos podido comprobar que la incidencia de la enfermedad en su manifestación clínica, es practicamente inexistente, no así ocurre en su forma serológica, ya que en animales adultos es bastante manifiesta, encontrandonos un gran número de animales, seropositivos por Elisa indirecto e Immunoblotting.

Ante estos resultados, sería recomendable hacer controles periódicos de estos animales, por ser posibles fuentes de infección y transmisión de la enfermedad, ya que la falta de este control, pueda llevar a la aparición esporádicamente en nuestro país de algún caso, con las consiguientes pérdidas económicas y sanitarias. Por eso, recomendamos realizar campañas de vacunación en los animales de mayor riesgo, como son los animales jóvenes y yeguas, puesto que hemos comprobado que la mayoría de la población equina española, está sin vacunar.

V - CONCLUSIONES

1. No se han encontrado diferencias significativas, respecto al clima, sexo, raza y habitabilidad, en cuanto a la distribución serológica y/o clínica de la Rinoneumonitis equina en España.

2. Respecto a la edad, se ha observado que los animales adultos no vacunados de Rinoneumonitis equina, presentan anticuerpos específicos frente al EHV-1, detectados por las distintas técnicas empleadas en el estudio (SN., ELISA INDIRECTO e IMMUNOBLOTTING).

3. Se ha puesto a punto, la técnica de Elisa indirecto, para la detección de anticuerpos de Rinoneumonitis equina, presentando unos resultados de sensibilidad y especificidad con relación a la Seroneutralización del 100% y 97,9%, respectivamente.

4. Se ha puesto a punto, la técnica de Immunoblotting, para la detección de anticuerpos de Rinoneumonitis equina, presentando unos índices de sensibilidad y especificidad, comparables a los obtenidos por Elisa indirecto.

5. En el Immunoblotting, las proteínas de peso molecular de 11,8 Kd, 14,8 Kd y 33 Kd, se presentan como las más representativas, para establecer un diagnóstico de Rinoneumonitis equina por este método.

6. El estudio serológico realizado, demuestra que la seropositividad frente al virus EHV-1 en animales no vacunados, está muy extendida en nuestro país.

VI - BIBLIOGRAFIA

.- ALLEN,G.P., YEARGEN,M.R., TURPINEN, L.W., BRYANS, J.T. AND McCOLLUM, W.H. (1983). Molecular epizootiologic studies of equine herpesvirus-1 infections by restriction endonuclease fingerprinting of virus DNA. Am. J. Vet. Res., 44: 263-271.

.- ALLEN,G.P. & BRYANS,T.B. (1986). Molecular epizootiology, pathogenesis, and prophylaxis of equine herpesvirus 1 infection. In: Pandey (ed) Progress in veterinary microbiology and immunology, Vol. 2. S. Karger, Basel, pp. 78-144.

.- ALLEN,G.P. & YEARGEN,M.R. (1987). Use of hgt 11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major glycoproteins to equine herpesvirus 1. J. Virol., 61: 2454-2461.

.- BABIUK,L.A., L'ITALIEN,J., VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK,S., ZAMB,T., LAWMAN,M.J.P., HUGHES,G. & GIFFORD,G.A. (1987). Protection of cattle from bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) infection by immunization with individual viral glycoproteins. Virology, 159: 57-66.

.- BAGUST, T. J. (1971). The equine herpesviruses. Vet. Bull., Weybridge, 41: 79-92.

.- BAGUST,T.J. et PACOE,R.R. (1972). Studies on Equine Herpesvirus. II Development of complement fixation test antigen of cell culture origin for equine herpes - 1 (Rhinopneumonitis) virus and use in a microtiter system. Archiv.fur.die gesamte virusforschung, 1972, 36, 240-244

.- BARTHA, A. (1970). The virology of equine herpesvirus 1 infection. In " Proc. 2nd int. Conf. Equine infect. Dis., Paris 1969", edited by J.T. Bryans & H. Gerber, Karger, Basel pp. 18-23.

.- BAUER,M.D. (1986). Análisis Clínicos. Métodos e interpretación. Editorial Reverté. pp.: 551-552.

.- BRYANS, J. T. (1969). On immunity to disease caused by equine herpesvirus 1. J. Am. Vet. Med. Ass., 155: 294-300.

.- BRYANS, J. T. & PRICKETT, M.E. (1970). A consideration of the pathogenesis of abortigenic disease caused by equine herpesvirus 1. In " Proc. 2nd int. Conf. Equine infect. Dis., Paris 1969 ", edited by J.T. Bryans & Gerber, Karger, Basel pp. 34-40.

.- BRYANS J.T., SWERCZEK, T.W., DARLINGTON, R.W. & CROWE M.W. (1977). Neonatal foal disease associated with perinatal infection by equine herpesvirus 1. J. Equine Med. Surg., 1: 20-26.

.- BRYANS, J. T. (1978). Immunization of pregnant mares with an inactivated equine herpesvirus 1 vaccine. In " Proc. 4th int. Conf. Equine infect. Dis., Lyon, 1976", edited by J. T. Bryans & H. Greber, Vet. Publ. Inc. Pricenton, New Jersey pp. 83-92.

.- BURROWS, R. (1970). The general virology of the herpesvirus group. In " Proc. 2nd int. Conf. Equine inf. Dis., Paris, 1969, edited by J.T. Bryans & H. Gerber, Karger, Basel pp.1-12.

.- BURROWS, R. & GOODRIDGE, D. (1973). In vivo and in vitro studies of equine rhinopneumonitis virus strains. In " Proc. 3rd int. Conf Equine infect. Dis., Paris, 1972 ", edited by J.T. Bryans & H. Gerber, Karger, Basel pp.306-321.

.- BURROWS, R. & GOODRIDGE, D. (1979). Equid herpesvirus 1 (EHV-1) : some observations on the epizootiology of infection and on the innocuity testing of live virus vaccines. Proc. 24th ann. Conf. Am. Ass. Equine Pract., 1978, pp.17-29.

.- CAMPBELL, T.M. and STUDDERT, M.J. (1983). Equine herpesvirus Type 1 (EHV-1). School of Veterinary Science. University of Melbourne (Australia). Veterinary Bulletin, Vol.53.(2): 135 - 143.

.- CHARLTON, K.M., MITCHELL, D., GIRARD, A. & CORNER, A.H. (1976). Meningo-encephalomyelitis in horses associated with equine herpesvirus 1 infection. Vet. Path., 13: 59-68.

.- CORNER, A.H., MITCHELL, D. & MEADS, E.B. (1963). Equine virus abortion in Canada I. Pathological studies on aborted fetuses. Cornell Vet., 53: 78-88.

.- CROWHURST, F.A., DICKINSON, G. & BURROWS, R. (1981). An outbreak of paresis in mares and geldings associated with equid herpesvirus 1. Vet. Rec., 109: 527-528.

.- DARLINGTON, R.W. (1978). The role of equine macrophages in resistance or susceptibility to infection by equine herpesvirus 1. In "Proc. 4th Int. Conf. Equine Inf. Dis., Lyon, 1976, edited by J.T. Bryans & H. Gerber. Vet. Publ. Inc., Princeton, New Jersey pp. 129-139.

.- DINTER, Z. & KLINGEBORN, B. (1976). Serological study of an outbreak of paresis due to equid herpesvirus 1 (EHV-1). Vet. Rec., 99: 10-12.

.- DIXON, R.J., HARTLEY, W.J., HUTCHINS, D.R., LEPHERD, E.E., FEILEN, C., JONES, R.F., LOVE, D.N., SABINE, M. & WELLS, A.L. (1977). Perinatal foal mortality associated with a herpesvirus. Aust. Vet. J., 53: 603-606.

.- DIXON, R.J., HARTLEY, W.J., HUTCHINS, D.R., LEPHERD, E.E., FEILEN, C., JONES, R.F., LOVE, D.N., SABINE, M. & WELLS, A.L. (1978). Perinatal foal mortality associated with a herpesvirus. Aust. Vet. J., 54: 103-105.

.- DOLL, E.R. (1953). Intrauterine and intrafetal inoculations with equine abortion virus in pregnant mares. Cornell Vet., 43: 112-121.

.- DOLL, E.R., CROWE, M.E.W., BRYANS, J.T. & McCOLLUM, W.H. (1955). Infection immunity in equine virus abortion. Cornell Vet., 45: 387-410.

.- DOLL, E.R. (1961). Immunization against viral rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hansters. J. Am. Vet. Med. Ass., 139: 1324-1330.

.- DOLL, E.R. & BRYANS, J.T. (1962a). Incubation periods for abortion in equine viral rhinopneumonitis. J. Am. Vet. Med. Ass., 141: 351-354.

.- DOLL, E.R. ET BRYANS, J.T. (1962b). Development of complement fixing and Virus - Neutralizing Antibodies in viral Rhinopneumonitis of Horses. Am. J. Vet. Res., 23 (95), 843-846.

.- DOLL, E.R. & BRYANS, J.T. (1963a). A planned infection program for immunizing mares against viral rhinopneumonitis. Cornell Vet., 53: 249-262.

.- DOLL, E.R. & BRYANS, J.T. (1963b). Epizootiology of equine viral rhinopneumonitis. J. Am. Vet. Med. Ass., 142: 31-37.

.- DOLL, E.R. & BRYANS, J.T. (1963c). Immunization of young horses against viral rhinopneumonitis. Cornell Vet., 53: 24-41.

.- DULBECCO, R. & GINSBERG, H.S. (1988). Virology. Second Edition. Published by J.B. Lippincott. Company. Printed in the United States of America. pp.: 161-173.

.- DUTTA, S.K. & SHIPLEY, W.D. (1975). Immunity and the level of neutralization antibodies in foals and mares vaccinated with a modified live-virus rhinopneumonitis vaccine. Am. J. Vet. Res., 36: 445-448.

.- DUTTA, S.K. & CAMPBELL, D.L. (1977). Cell mediated immunity in equine herpesvirus type 1 infection 1. In vitro lymphocyte blastogenesis and serum neutralization antibody in normal parturient and aborting mares. *Can. J. Comp. Med.*, 41: 404-408.

.- DUTTA, S.K., MYRUP, A. & BURGARDNER, M.K. (1980). Lymphocyte responses to virus and mitogen in ponies during experimental infection with equine herpesvirus 1. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 2066-2068.

.- DUTTA, S.K., TALBOT, H.C. et MYRUP, A.C. (1983). Detection of equine herpesvirus-1 antigen and the specific antibody enzyme-linked immunosorbente assay. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 1930-1934.

.- ESCRIBANO, J.M., TABARES, E. (1987). Proteins Specified by African Swine Fever Virus: V.- Identification of Immediate Early, Early and Late Proteins. *Arch. Virol*, 92: 221-232.

.- FETNIS, T. (1980). Humoral and cell-mediated immune response of foals vaccinated with attenuated equine herpesvirus type 1 (EHV-1). *Zentbl. Vet. Med.*, 27B: 742-758.

.- GERBER, J.D., MARROW, A.E., BASS, E.P. & BECKENHAUER, W.H. (1977). Effect of age and pregnancy on the antibody and cell-mediated immune responses of horses to equine herpesvirus 1. *Can. J. Comp. Med.*, 41: 471-478.

.- GLEESON, L.J. & COGGINS, L. (1980). Response of pregnant mares to equine herpesvirus 1 (EHV-1). *Cornell Vet.*, 70: 391-400.

.- GREENWOOD, R.E.S. & SIMSON, A.R.B. (1980). Clinical report of a paralytic syndrome affecting stallions, mares and foals on a Thoroughbred studfarm. *Equine Vet. J.*, 12: 113-117.

- .- HARTLEY, W.J. & DIXON, R.J. (1979). An outbreak of foal perinatal mortality due to equid herpesvirus type 1 : pathological observations. *Equine Vet. J.*, 11: 215-218.
- .- JACKSON, T.A. & KENDRICK, J.W. (1971). Paralysis of horses associated with equine herpesvirus 1 infection. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 158: 1351-1357.
- .- JACKSON, T.A., OSBURN, B.I., CORDY, D.R. & KENDRICK, J.W. (1977). Equine herpesvirus 1 infection of horses: studies on the experimentally induced neurologic disease. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 709-718.
- .- KAJI, T (1963). Epizootiological investigation of equine rhinopneumonitis by Complement fixation test. II-Pattern of antibody response and accumulation of infection in horses observed consecutively four times. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.*, 3: 64-78.
- .- KASAKURA, S. (1971). A factor in maternal plasma during pregnancy that suppresses the reactivity of mixed leukocyte cultures. *J. Immun.*, 107: 1296-1301.
- .- KAWAKAMI, Y., TOKUI, T., NAKANO, K., KUME, T., HIRAMUNE, T. & MURASE, N. (1970). (An outbreak of abortion due to equine rhinopneumonitis virus among mares in the Hidaka district, Hokkaido. I. Epizootiological survey and virus isolation.) *Bull Natn. Inst. Anim. Hlth*, 61: 9-16
- .- KENDRICK, J.W. & STEVENSON, W. (1979). Immunity to equine herpesvirus 1 infection in foals during the first year of live. *J. Reprod. Fert.*, 27: 615-618.
- .- LITTLE, P.B. & THORSEN, J. (1976). Disseminated necrotizing myeloencephalitis: a herpes - associated neurological disease of horses. *Vet. Path.*, 13: 161-171.

.- LIU, I.K. (1979). Discussions on equine herpesvirus - 1 and equine influenza. Proc. 24th ann. Conf. Am. Ass. Equine Pract., 1978. pp. 80-88.

.- MARTIN, B.R. & LARSEN, K.A. (1973). Immune response of equine fetus to coliphage T₂. Am.J.Vet.Res., 34: 1363-1364.

.- MCGEE, W.R. (1970). Clinical aspects of disease caused by equine herpesvirus - 1. In "Proc. 2nd int. Conf. Equine infect. Dis., Paris, 1969", edited by J.T.Bryans & H.Gerber. Karger, Basel pp. 13-17.

.- MEYER, H., HUBERT, P.M. and EICHMORN, W. (1987). Changes on Restriction Enzyme Pattern of the Equine Herpesvirus Type-1 (EHV-1) Strain Ras-M DNA During Attenuation. J. Vet. Med. B, 34: 310-313.

.- MORGAN, D.O., BRYANS, J.T. & MOCK, R.E. (1975). Immunoglobulins produced by the antigenized equine fetus. J. Reprod. Fert., 23: 735-738.

.- MUMFORD, J.A. & EDINGTON, N (1980). EHV-1 and equine paresis. Vet.Res., 106: 277-280.

.- O'CALLAGHAN, D.J., ALLEN, G.P. & RANDALL, C.C. (1978). Structure and replication of the equine herpesviruses. In " Proc. 4th int. Conf. Equine infect. Dis., Lyon, 1976 ", edited by J.T.Bryans & H.Gerber. Vet.Publ. Inc., Princeton, New Jersey pp. 1-31.

.- PACCIARELLI, J.A. & BRYANS, J.T. (1978). Cellular immunity to equine rhinopneumonitis virus in pregnant mares. In " Proc. 4th int. Conf. Equine infect. Dis., Lyon, 1976 ", edited by J.T. Bryans & H.Gerber, Vet. Publ. Inc., Princeton, New Jersey.

- .- PASTOR, M.J., SANCHEZ - VIZCAINO, J.M. Y ESCRIBANO, J.M. (1988). Dos nuevas técnicas para el diagnóstico de la Peste Porcina Africana: Inmunoelctrotransferencia y enzimo-inmuno-adsorción. *Medicina Veterinaria*, 5 (5-6): 275-282.
- .- PELLERIN, J.L., GERAL, M.F. et LAUTIER, R. (1989). Le Test immuno-enzymatique ELISA dans le diagnostic serologique de la brucellose humaine. *Rev. Med. Vet.*, 131 (11): 741-766.
- .- PLATT, H., SINGH, H. & WHITWELL, K.E. (1986). Pathological observations on an outbreak of paralysis in breedmares. *Equine Vet. J.*, 12: 118-126.
- .- POWELL, D.G., BURROWS, R., SPOONER, P.R., GOODRIDGE, D., THOMSON, G.R. & HUMFORD, J. (1978). A study of infectious respiratory disease among horses in Great Britain, 1971 - 1976. In "Proc. 4th int. Conf. Equine inf. Dis., Lyon, 1976", edited by J.T. Bryans & H. Gerber. *Vet. Publ. Inc.* Princeton, New Jersey pp. 451-459.
- .- PRICKETT, M.E. (1970). The pathology of disease caused by equine herpesvirus 1. In "Proc. 2nd int. Conf. Equine infect. Dis., Paris, 1969, edited by J.T. Bryans & H. Gerber. *Karger, Basel* pp. 24-33.
- .- PRICKETT, M.E. & BRYANS, J.T. (1970). Discussions and short communications to part 1, *Equine infect. Dis.*, Paris, 1969, edited by J.T. Bryans & H. Gerber. *Karger, Basel* p. 60.
- .- PUMAROLA, A., RODRIGUEZ - TORRES, A., GARCIA RODRIGUEZ, J.A. Y PIEDROLA - ANGULO, G. (1987). *Microbiología y Parasitología Médica*. Editorial Salvat. 2ª edición. pp.: 628-641.
- .- SABINE, M. (1979). Equine herpesvirus abortion in Australia. *Proc. Post-Grad. Comm. vet. Sci., Univ. Sydney* No 41 pp. 215-219.

.- SABINE,M. (1980). Differentiation of equine herpesviruses of type 1. Aust. Vet. J., 56: 44-45.

.- SABINE,M., ROBERTSON,G.R. & WHALLEY,J.M. (1981). Differentiation of sub-types of equine herpesvirus 1 by restriction endonuclease analysis. Aust. Vet. J., 57: 148-149.

.- SANCHEZ-VIZCAINO,J.M., TABARES,E., SALVADOR,E. Y ORDAS,A. (1982). Semipurified Structural Viral protein for the detection of ASF. antibodies dy indirect Elisa technique. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. 22: 214-222.

.- SAKESGAARD,F. (1966). Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis. Nord. Vet. Med., 18: 504-512.

.- SHIMIZU,T., ISHIZAKI,R., ISHII,S., KAWAKAMI,Y., KAJI,T., SUGIMURA,K. & MATUMOTO,M. (1959). Isolation of equine abortion virus from natural cases of equine abortion in horse kidney cell culture. Jap. J. Exp. Med., 29: 643-649.

.- SHIMIZU,M., SATOU,K. & NISHIOKA,N. (1989). Monoclonal antibodies with neutralizing activity to equine herpesvirus 1. Arch. Virol., 104: 169-174.

.- SOULA,A., LAURENT,N., TIXIER,G. et MOREAU,Y. (1982). Elisa DR.-expression d'un titre Elisa 50 p. cent. 17 th. International congress on Herpes Virus of Man and animal: standardization of immunological. Procedures, Lyon, France, 1981, Biol. Standard, 52: 147-157.

.- STUBBERT,M.J. (1974). Comparative aspects of equine herpesviruses. Cornell Vet., 69: 94-122.

. - STUDDERT, M.J. & BLACKNEY, M.H. (1979). Equine herpesviruses: on the differentiation of respiratory from foetal strains of type 1, Aust. Vet. J., 55: 488-492.

. - STUDDERT, M.J., SIMSON, T. & ROIZMAN, B. (1981). Differentiation of respiratory and abortigenic isolates of equine herpesvirus 1 by restriction endonucleases. Science. USA 214, 562-564.

. - STUDDERT, M.J., FITZPATRICK, D.R., HORNER, G.W., WESTBURY, H.A. & GLEESONS, L.J. (1984). Molecular epidemiology and pathogenesis of some equine herpesvirus type 1 (equine abortion virus) and type 4 (equine rhinopneumonitis virus) isolates. Australian Veterinary Journal, 61 (11): 111-114.

. - STUDDERT, M.J., FITZPATRICK, D.R., BROWNING, G.F., CILLINANE, A.A. and WHALLEY, J.M. (1986). Equine herpesvirus genomes: heterogeneity of naturally occurring type 4 isolates and of a type 1 isolate after heterologous cell passage. Arch. Virol., 91: 375-381.

. - THEIN, P. (1981). Infection of the central nervous system of horses with equine herpesvirus serotype 1. J.S. Afr. Vet. Med. Ass., 52: 239-241.

. - THOMSON, G.R., MUMFORD, J.A., CAMPBELL, J., GRIFFITHS, L. & CLAPHAM, P. (1976). Serological detection of equid herpesvirus 1 infections of the respiratory tract. Equine Vet. J., 8: 58-63.

. - THOMSON, G.R., MUMFORD, J.A. & SMITH, J.M. (1979). Experimental immunization against respiratory disease due to equid herpesvirus 1 infection (rhinopneumonitis) using formalin-inactivated virus with various adjuvants. Vet. Microbiol., 4: 209-222.

. - TURTIMEN, L.W., ALLEN, G.P., DARLINGTON, R.W. & BRYANS, J.T. (1981). Serologic and molecular comparisons of several equine herpesvirus type 1 strains. Am. J. Vet. Res., 42: 2099-2104.

.- TORTINEN, L.W. & ALLEN, G.P. (1982). Identification of the envelope surface glycoproteins of equine herpesvirus type 1. J. Gen. Virol., 63: 481-485.

.- VULCANO, G., CHEYROUX, M. et JACQUET, A. (1988). Rhinopneumonie équine à herpès virus équin 1. Comparaison des techniques de séroneutralisation, de fixation du complément, et d'ELISA. Rec. Méd. Vét., 164 (8 - 9): 641-646.

.- WILKS, C.R. & COGGINS, L. (1976). Immunity to equine herpesvirus type 1 (rhinopneumonitis): in vitro lymphocyte response. Am.J.Vet.Res., 37: 487-492.

.- WILKS, C.R. & COGGINS, L. (1977a). In vitro cytotoxicity of serum and peripheral blood leukocytes for equine herpesvirus type 1 infected target cells. Am.J.Vet.Res., 38: 117-121.

.- WILKS, C.R. & COGGINS, L. (1977b). Protective immunity in equine herpesvirus type 1 infection of hamsters. Cornell Vet., 67: 385-403.

.- WILLIAN, E. (1988). Developing vaccines for equine herpes. Equine Sportsmedicine News. Vol. 7, Number 3, March.

